

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Soňa Čejková

**Úloha perivaskulární tukové tkáně v rozvoji kardiovaskulárních
onemocnění**

Role of perivascular fat tissue in the development of cardiovascular diseases

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jana Ždychová, Ph.D.

Praha rok 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením Mgr. Jany Ždychové, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2014

.....

Soňa Čejková

Poděkování:

Děkuji své školitelce Mgr. Janě Ždychové, PhD. za trpělivost, obětavost, cenné rady a odborné vedení, které mi věnovala během vypracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala všem členům Oddělení metabolismu diabetu v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze za pomoc, ochotu a přátelské prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli za pevné zázemí a podporu během studia.

Abstrakt

Abnormální proliferace buněk hladké svaloviny cév (VSMC) hraje důležitou roli v patogenezi aterosklerózy. Adipocyty produkují řadu parakrinně působících bioaktivních látek, které mohou působit na růst a migraci VSMC. Naše studie je zaměřena na schopnost epikardiálních adipocytů produkovat bioaktivní látky s přímým efektem na míru proliferace VSMC.

Genová exprese lidských cytokinů (IL-6, IL-8, IL-18, RANTES a MCP-1) a adipokinů (leptin a adiponektin) byly měřeny v primární buněčné kultuře epikardiálních a viscerálních adipocytů, obojí v případě nediferencovaného a maturovaného stavu buněk. Produkce adipokinů (IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF a adiponektin) v kondiciovaných médiích byla měřena pomocí Luminex testu. Míra proliferace VSMC byla měřena po kokultivaci s médiem získaným z primárních kultur adipocytů.

Epikardiální preadipocyty prokázaly zvýšenou expresi IL-8 (3,25krát, $p < 0,05$) ve srovnání s viscerálními preadipocyty. Exprese adiponektinu v epikardiálních preadipocytech byla výrazně snížena ve srovnání s expresí ve viscerálních preadipocytech ($p < 0,0001$). Kromě toho genová exprese závisela na míře diferenciaci a buněčném původu. Pozorovali jsme změněnou expresi IL-8 (0,016krát, $p < 0,01$) a MCP-1 (0,19krát, $p < 0,05$) v diferencovaných epikardiálních adipocytech oproti nediferencovaným adipocytům. Prokázali jsme vyšší koncentrace MCP-1 v kondiciovaném médiu renálních preadipocytů ve srovnání s VSMC kontrolou ($p < 0,05$). Jak kondiciované medium viscerálních preadipocytů, tak medium epikardiálních adipocytů, vykazovalo vyšší koncentraci VEGF oproti kontrolnímu médiu z VSMC ($p < 0,001$). Obsah adiponektinu v médiu viscerálních adipocytů bylo zvýšené oproti zbývajícím adipocytárním médiím, stejně tak vůči VSMC kontrole ($p < 0,01$). Kromě toho výsledky ukázaly vyšší proliferaci VSMC po kokultivaci s epikardiálním adipocytárním kondiciovaným médiem ve srovnání s VSMC kontrolou ($p < 0,05$).

Výsledky naznačují, že epikardiální adipocyty se podstatně liší od viscerálních adipocytů. Navíc se zdá, že bioaktivní látky produkované adipocyty mají stimulační účinky na proliferaci VSMC, což by mohlo lokálně přispívat k rozvoji proliferativního onemocnění cév.

Klíčová slova: Perivaskulární tuková tkáň, buňky hladké svaloviny cév, ateroskleróza, kardiovaskulární poruchy

Abstract

Abnormal vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation is thought to play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis. Adipocytes produce several paracrine bioactive substances that can affect VSMC growth and migration. Our study focused on the ability of epicardial adipocytes to produce bioactive substances together with studying of direct effect of these substances on the VSMC proliferation rate.

The gene expression of human cytokines (IL-6, IL-8, IL-18, RANTES and MCP-1) and adipokines (leptin and adiponectin) was measured in primary cell lines of epicardial and visceral adipocytes, both in undifferentiated and mature statuses. Moreover, adipokine production (IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF and adiponectin) in conditioned media obtained from above mentioned primary cell cultures of adipocytes was measured by a Luminex assay. The VSMC proliferation rate was measured after co-culturing with CM obtained from primary cell cultures of adipocytes.

The epicardial preadipocytes showed an increased expression of IL-8 (3,25-fold, $p<0,05$) compared with visceral preadipocytes. The expression of the adiponectin in epicardial preadipocytes was markedly decreased in comparison of the expression in visceral preadipocytes ($p<0,0001$). Moreover, the gene expression was dependent on the differentiation degree and cell origin. We observed an altered expression of the IL-8 (0,016-fold, $p<0,01$) and MCP-1 (0,19-fold, $p<0,05$) in differentiated epicardial adipocytes compared with undifferentiated adipocytes. We proved that there was a higher concentration of MCP-1 in renal preadipocyte conditioned media compared to the VSMC control ($p<0,05$). The addition of both visceral preadipocytes and epicardial adipocyte conditioned media resulted in the elevated production of VEGF compared to the control VSMC conditioned media ($p<0,001$). Adiponectin content in visceral adipocyte conditioned media increased compared to all remaining adipocyte conditioned media as well as to the VSMC control ($p<0,01$). Moreover, results showed a higher VSMC proliferation rate after co-culturing with epicardial adipocyte conditioned media compared to the VSMC control ($p<0,05$).

Our results suggest that epicardial adipocytes substantially differ from visceral adipocytes. Moreover, it seems that bioactive substances produced by adipocytes have a stimulating effect on VSMC proliferation that might locally contribute to the development of proliferative vascular disease.

Key words: Perivascular adipose tissue, vascular smooth muscle cells, atherosclerosis, cardiovascular disease

1	Seznam zkratk	8
2	Úvod.....	12
3	Teoretická část	14
3.1	Tuková tkáň	14
3.1.1	Subkutánní tuková tkáň	15
3.1.2	Viscerální tuková tkáň	16
3.1.3	Perivaskulární tuková tkáň.....	17
3.1.4	Epikardiální tuková tkáň.....	18
3.2	Ateroskleróza	19
3.2.1	Patogeneze aterosklerózy.....	20
3.2.1.1	Zánětlivé procesy	23
3.2.2	Rizikové faktory.....	25
3.2.2.1	Oxidační stres	25
3.2.2.2	Lipoproteiny.....	26
3.2.2.3	Diabetes.....	27
3.2.2.4	Hypertenze.....	29
3.2.2.5	Pohlavní hormony.....	30
3.3	Role VSMC v rozvoji aterosklerózy.....	30
3.3.1	Fenotypový přesmyk, migrace a proliferace.....	30
3.3.2	Tvorba extracelulární matrix	31
3.3.3	Exprese prozánětlivých genů a oxidační stres	33
3.4	Látky produkované tukovou tkání	33
3.4.1	Interleukin – 6.....	33
3.4.2	Interleukin – 8.....	34
3.4.3	Monocytární chemoatraktivní protein – 1 (MCP-1).....	34
3.4.4	Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF).....	35
3.4.5	Adiponektin.....	35

3.4.6	Leptin.....	37
4	Cíle diplomové práce.....	39
5	Metody a materiál	40
5.1	Buněčné kultury	40
5.1.1	Oil-red O barvení.....	41
5.2	RT-PCR analýza	41
5.3	Proliferační assay	45
5.4	Luminex assay	45
5.5	Statistická analýza.....	47
6	Výsledky	48
6.1	Genové exprese v primárních buněčných liniích adipocytů a preadipocytů.....	48
6.2	Produkce adipokinů v médiu z nediferencovaných a maturovaných buněčných linií lidských adipocytů	49
6.3	Vliv kokultivace adipocytů a buněk hladké svaloviny aorty na proliferaci	53
7	Diskuze	54
8	Závěr	58
9	Literatura.....	59

1 Seznam zkratek

ABCA1	ABC (ATP Binding Cassette) transportér podtřídy A1
ACAT-2	Acyl-koenzym A cholesterol acyltransferáza
ACE	Angiotensin konvertující enzym
ADP	Adenosin difosfát
AT _{1/2}	Angiotensinový receptor 1/2
B2M	Beta-2-mikroglobulin
BMI	Index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)
BSA	Hovězí sérový albumin
CTGF	Růstový faktor pro pojivové tkáně
CCR2	C-C chemokinový receptor typ 2 (receptor pro MCP-1)
DC	Dendritická buňka
EAT	Epikardiální tuková tkáň
ECM	Extracelulární matrix
ERK 1/2	Extracelulárním signálem regulované kinázy
ERK-5	Extracelulární signálem regulovaná kináza 5
ET	Endotelin
FACoA	Mastná kyselina navázaná na koenzym A
Fas	Transmembránový protein typu II z rodiny TNF cytokinů
FasL	Fas ligand
FC	Pěnová buňka (foam cell)
G-/GM-/M-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytární/granulocytární a makrofágové/ makrofágové
gp130	Glykoprotein 130
HAoSMC	Lidské aortální buňky hladké svaloviny
HDAC4	Histon deacetyláza 4

HDL	Lipoprotein o vysoké hustotě
i/eNOS	Indukovaná/ endoteliální NO syntáza
ICAM-1/sICAM-1	Intracelulární adhezní molekula - 1/solubilní intracelulární adhezní molekula - 1
IDL	Lipoproteiny se střední hustotou
IKK	I κ B kináza
IL	Interleukin
IRS-1	Inzulinový receptorový substrát 1
I κ B	Inhibitor κ B
JAK	Janus kináza
LDL	Lipoprotein o nízké hustotě
LDL-C	Cholesterolový lipoprotein o nízké hustotě
LRP6	LDL receptor-související s proteinem 6
LXR	Jaterní X receptor (jaderný receptor)
MAP	Mitogeny aktivovaný protein
MAPK	MAP kináza
MCP-1	Monocytární chemoatraktivní protein 1
MF	Makrofág
MFI	Střední intenzita fluorescence
MKP-1	MAPK fosfatáza 1
MMP	Matrixové metalo proteázy
mTOR	Serin/treoninová protein kináza (Mechanistic Target Of Rapamycin)
NADH	Redukovaný Nikotinamidadenin dinukleotid
NDPH	Redukovaný Nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
NF- κ B	Jaderný faktor κ b
NMN	Nikotinamid mononukleotid

NO	Oxid dusnatý
NOS	Syntáza oxidu dusnatého
oxLDL	Oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě
oxHDL	Oxidovaný lipoprotein o vysoké hustotě
p90RSK	P90 ribozomální S6 kináza
PAI-1	Inhibitor plazminovéhoaktivátoru - 1
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)
PDGF	Růstový faktor z destiček (platelet derived grow factor)
PDGFR- β	PDGF receptor β
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kináza
PKC	Protein kináza C
PPAR	Receptor aktivovaných peroxizomálních proliferátorů
PRR	Vzor rozpoznávající receptor
PVAT	Perivaskulární tuková tkáň (perivascular adipose tissue)
RAF	Rekombinační aktivační faktor
Rho	Enzym z rodiny malých GTPáz
ROCK	Rho-asociovaná protein kináza
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SD	Směrodatná odchylka
SMC	Buňky hladké svaloviny
STAT1	Signálový předovnik a aktivátor transkripce
SVF	Stromální vaskulární frakce
TGF- β	Tranformující růstový faktor β
TLR	Toll like receptor
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor α
TT	Tuková tkáň

VCAM-1	Adhezní molekula buněk cév (Vascular cell adhesion molecule)
VHDL	Lipoproteiny o velmi vysoké hustotě
VLDL	Lipoprotein o velmi nízké hustotě
VSMC	Buňky hladké svaloviny cév
WNT	Glykoprotein podílející se na vývojových procesech

2 Úvod

Obezita je jednou z nejběžnějších zdravotních komplikací, které čelí moderní svět a stále více se začíná projevovat již u dětí a mladistvých. Představa, že tuková tkáň (TT) je pouze zásobárnou energie, tepelná izolace, případně že vytváří mechanickou oporu vnitřním orgánům, je již přezíték. Ukazuje se, že se jedná o největší endokrinní orgán v těle. TT produkuje řadu bioaktivních látek včetně řady cytokinů, působí tedy i jako imunologicky aktivní orgán. Produkované působky účinkují endokrinně, parakrinně i autokrinně.

U obézních jedinců se často vyskytují např. poruchy lipidového metabolismu se zvýšenými hladinami plasmatických lipoproteinů, volných mastných kyselin a cholesterolu v krvi, hyperinzulinémie, hypertenze a přítomný je i chronický mírný stupeň zánětu (Bergman et al., 2007; Després et al., 2008). Právě přítomnost subklinického chronického zánětu spojuje tukovou tkáň, inzulinovou rezistenci, patogenezi aterosklerózy a diabetes 2. typu. Cirkulující hladiny adipokinů, tj. působků produkovaných TT, pak lze využít jako ukazatele k hodnocení řady chorob spojených s obezitou. Například práce Fantuzzi a kol. (2005) uvádí vyšší hladiny zánětlivých markerů, jako jsou C-reaktivní protein nebo IL-6 u obézních jedinců v porovnání se zdravými kontrolami. Což autoři dávají do souvislosti s vyšší pravděpodobností rozvoje kardiovaskulárních chorob a diabetu 2. typu (Fantuzzi, 2005).

Je to právě ateroskleróza a komplikace s ní spojené (infarkt myokardu, angína pectoris, iktus, hypertenze, ischemická choroba dolních končetin a další), které jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí v západním světě. K rozvoji aterosklerózy dochází pravděpodobně vlivem chronického zánětu vzniklého jednak v důsledku genetických predispozic, ale výrazným způsobem se uplatňuje i vliv životního stylu. Na vzniku a rozvoji aterosklerózy se podílí řada buněčných a molekulárních mechanismů.

V předložené diplomové práci se zaměřuji hlavně na úlohu perivaskulární tukové tkáně (PVAT) v patogenezi aterosklerózy. PVAT představuje zvláštní druh viscerální tukové tkáně obklopující většinu cév. Původně se mělo za to, že funguje spíše jako opora cév. Studie však prokázaly, že i PVAT, podobně jako viscerální tuková tkáň, produkuje řadu bioaktivních látek transdukujících signály do blízkých cév parakrinním nebo vasokrinním způsobem (Chatterjee et al., 2009). Několik studií pak prokázalo

souvislost mezi PVAT a jejím vlivem na rozvoj aterosklerózy (Mazurek et al., 2003; Yudkin et al., 2005)

3 Teoretická část

3.1 Tuková tkáň

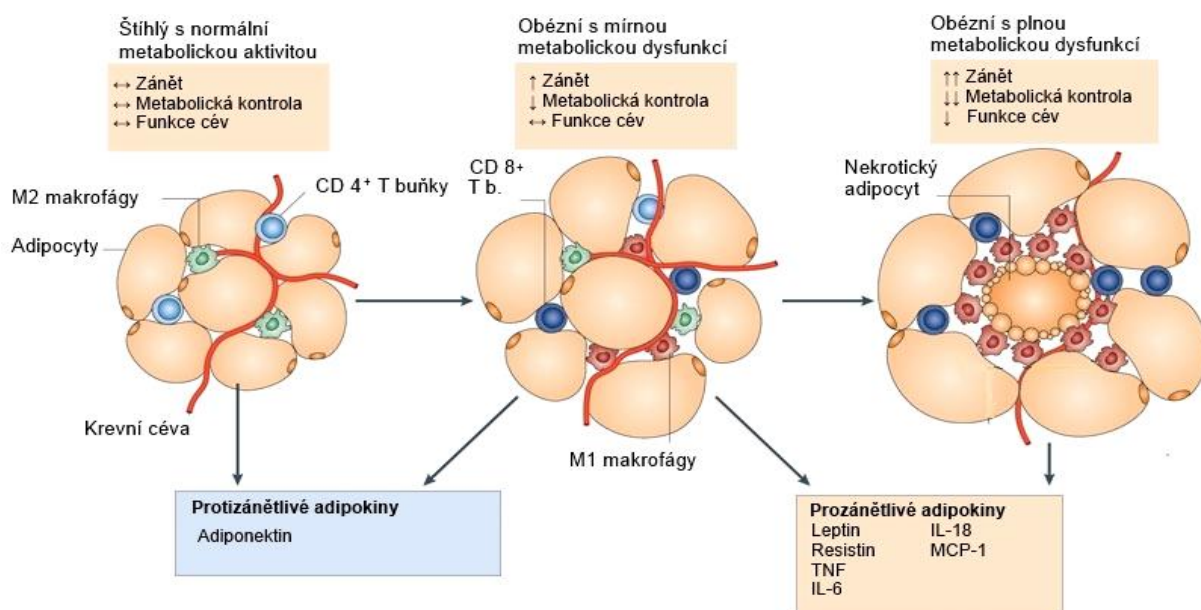
Tuková tkáň (TT) není tvořena pouze adipocyty, ale i řadou dalších buněčných typů jako jsou fibroblasty, endotelie, imunokompetentní buňky a řada dalších. TT je rovněž inervována a protkána cévním řečištěm.

Tukovou tkáň lze dělit z řady hledisek. Například na bílou tukovou tkáň a hnědou tukovou tkáň. Více rozšířená bílá tuková tkáň je tvořena adipocyty s velkými tukovými kapénkami v cytoplasmě a malým množstvím mitochondrií. Hnědá tuková tkáň se vyskytuje hlavně u novorozenců. Později ji lze nalézt v horní oblasti hrudi a krku, u obézních jedinců je však velmi zredukována nebo chybí úplně (van Marken Lichtenbelt et al., 2009). Pro hnědou tukovou tkáň jsou typické adipocyty s malými tukovými kapénkami a velkým množstvím mitochondrií (Cinti et al., 2005).

Tukovou tkáň lze však dělit i na subkutánní a viscerální tukovou tkáň. Subkutánní TT má poněkud nižší produkci prozánětlivých látek a korelaci s oxidativním stresem ve srovnání s viscerálním tukem (Pou et al., 2007). Oproti viscerálnímu tuku exprimuje větší množství adiponektinu, který vykazuje protiatrogenní účinky, a leptinu, který reguluje potřeby příjmu energie (Staiger et al., 2003). Je známo, že viscerální TT produkuje řadu adipokinů ovlivňujících množství procesů. Jedná se zejména o prozánětlivé děje, jež mohou vyústit ve velmi komplexní poruchy, mezi něž patří například inzulinová rezistence, metabolický syndrom, nebo diabetes 2. typu (Gustafson et al., 2007).

Zvyšuje-li se ukládání tuku a rozvoj obezity, dochází v TT k strukturním a funkčním změnám, od TT u štíhlých jedinců s normální metabolickou aktivitou, nižší infiltrací imunokompetentních buněk a nižší produkcí prozánětlivých látek, přes TT jedinců s nadváhou s mírnou metabolickou dysfunkcí, až po TT obézních pacientů s plnou metabolickou dysfunkcí (Ouchi et al., 2011). V závislosti na nutričním stavu pak kolísá obsah lipidů uložených v adipocytech, což mění nejen velikost adipocytů, ale i jejich metabolické vlastnosti. Adipocyty obézních jedinců hypertrofují, zvyšují své zásoby triglyceridů, vykazují sníženou citlivost k inzulinu a v souvislosti s mírou obezity mění i endokrinní produkci. U obézních osob se proto zvyšuje produkce prozánětlivých

faktorů stimulujících mimo jiné i zvýšenou infiltraci imunokompetentních buněk, hlavně MF. Naopak produkce protizánětlivých faktorů, jakým je například adiponektin, se snižuje (viz obr. 1) (Ouchi et al., 2011). Obezita, zejména abdominálního typu s převahou viscerálního tuku, je proto považována za významný rizikový faktor pro rozvoj řady chorob, jako je hypertenze, dyslipidemie, inzulinová rezistence, diabetes 2. typu, ateroskleróza a s ní spojené komplikace, a další (Després et al., 2008; Ibrahim, 2010; Onat et al., 2004).



Obr. 1: S rozvojem obezity dochází k strukturálním i funkčním změnám TT. S rozvojem obezity adipocyty zvětšují svůj objem, ve zvýšené míře ukládají lipidy ve formě kapének a mění své metabolické vlastnosti i charakter endokrinní produkce. Ve zvýšené míře produkují prozánětlivé faktory (leptin, resistin, TNF α , IL-6, IL-18, MCP-1). Hypertrofigické obézní adipocyty i častěji podléhají nekrotickému procesu. TT obézních jedinců je více infiltrována imunokompetentními buňkami (především makrofágy, ale nepochybně se zde vyskytují i další podtypy včetně lymfocytů a řady dalších). Aktivované makrofágy obézních jedinců (aktivované klasickou cestou na M1 makrofágy) rovněž produkují prozánětlivé cytokiny, což může zčásti vysvětlovat přítomnost mírného chronického zánětu u pacientů s obezitou. (Ouchi et al., 2011)

3.1.1 Subkutánní tuková tkáň

Subkutánní tuková tkáň se nachází v podkoží. Je obvykle tvořena dvěma vrstvami oddělenými fascií. Velmi dobře může být monitorována a měřena neinvazivně pomocí magnetické rezonance (Querleux et al., 2002). Nejvíce podkožního tuku se ukládá v oblasti stehen, hýždí a anteriorní abdominální stěny. Převaha podkožního tuku

je typická spíše pro gynoidní typ obezity (ukládání tuku převážně v dolní oblasti těla). Subkutánní tuk představuje zhruba 80 % tukových zásob (Ibrahim, 2010). Subkutánní TT bývá poněkud méně zásobena krví a v porovnání s viscerální TT bývá i méně inervována. V subkutánní TT dochází k vyšší expresi receptorů pro estrogeny (Pedersen et al., 1996), což může souviset i s rozdílným ukládáním tuku u žen a mužů.

3.1.2 Viscerální tuková tkáň

Viscerální tuková tkáň obklopuje vnitřní orgány v břišní dutině, mesenteriu, omentu, retroperitoneu a v oblasti gonád. Viscerální TT je obecně považována za důležitější v rozvoji kardiovaskulárních chorob a dalších komplikací spojených s obezitou (Bruun et al., 2005; Fain et al., 2004; Kershaw and Flier, 2004). Představuje zhruba 10-20 % tuku u mužů; v případě žen to je kolem 5-8 % (Ibrahim, 2010). Abdominální obezita s ukládáním tuku v oblasti břicha je typická spíše pro muže. Obezita tohoto typu je považována za rizikový faktor a může být jedním z důvodů, proč muže již v mladším věku postihují kardiovaskulární potíže častěji než ženy.

Produkce různých prozánětlivých cytokinů jako je IL-8 (u štíhlých i obézních je produkován ve větším množství ve viscerální TT) (Bruun et al., 2004), MCP-1 (Bruun et al., 2005), IL-6, VEGF (Fain et al., 2004), TNF- α a další (Curat et al., 2006; Kershaw and Flier, 2004).

Adipocyty z viscerální tukové tkáně vykazují vyšší míru inzulinové rezistence oproti subkutánnímu tuku (Frayn, 2000). Viscerální TT je v porovnání se subkutánním tukem více metabolicky aktivní. Např. epididimální adipocyty (druh viscerálních adipocytů) mají více mitochondrií, vyšší cytochrom c oxidázovou aktivitu a vyšší respirační obrát než subkutánní TT (Deveaud et al., 2004). Co se týče lipoprotein lipázové aktivity v některých pracích je uváděna vyšší aktivita ve viscerálním tuku (Ruge et al., 2006), v jiných studiích je naopak uváděna převažující aktivita v subkutánním tuku (Tchernof et al., 2006). Viscerální adipocyty mají i vyšší lipolytickou aktivitu indukovanou katecholaminy, kdy dochází k vyššímu uvolňování volných mastných kyselin do oběhu, v důsledku čehož může docházet k aktivaci prozánětlivého fenotypu imunokompetentních buněk (Ouchi et al., 2011), nebo k vývoji hyperglykémie, hyperinzulinémie, případně inzulinové rezistence (Heilbronn et al., 2004). Toto

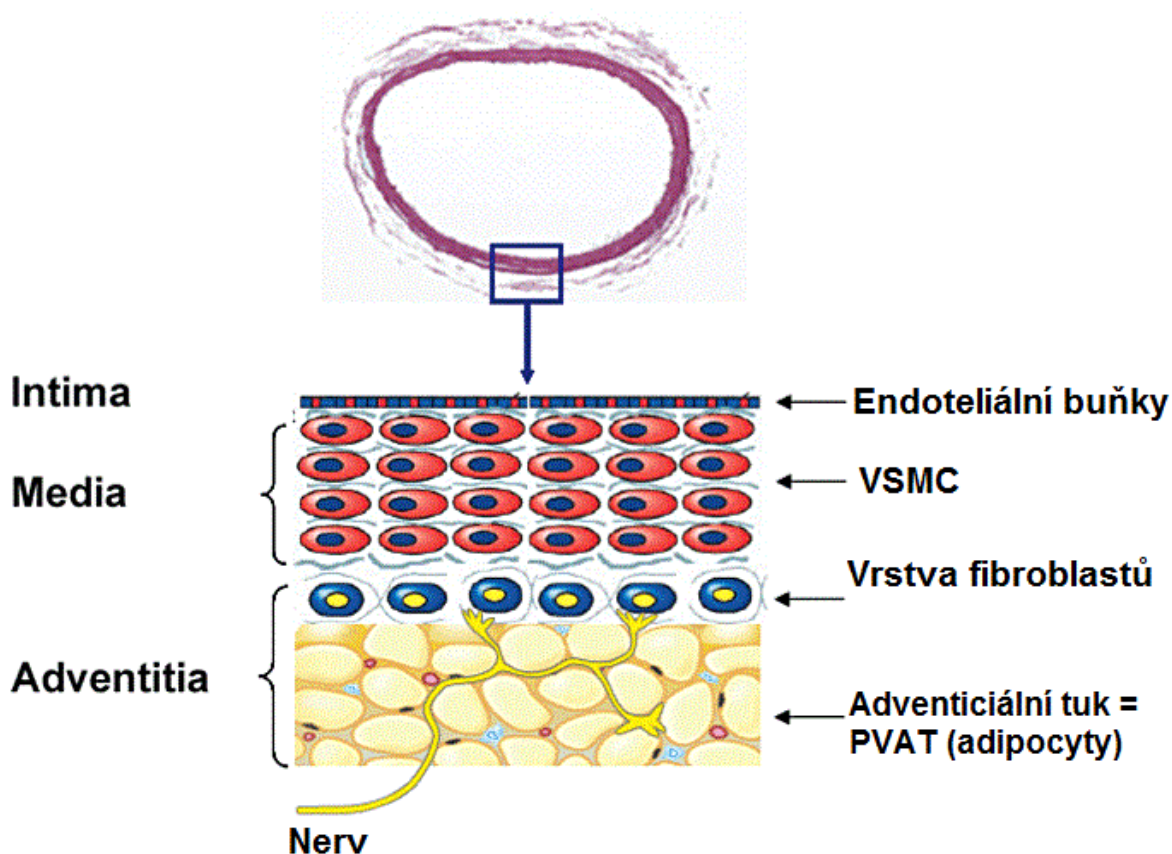
je označováno jako tzv. portální hypotéza (Heilbronn et al., 2004). Zjednodušeně lze říci, že podle této hypotézy dochází k rozvoji inzulinové rezistence vlivem změny metabolických vlastností viscerálních adipocytů v důsledku nárůstu objemu viscerální tukové masy a to i nezávisle na množství podkožního tuku (Yang et al., 2008).

3.1.3 Perivaskulární tuková tkáň

Perivaskulární TT je druhem viscerálního tuku. Zánětlivé procesy v endotelu vyvolávají adhezi a migraci leukocytů, MF a progenitorových buněk do stěn cév (Chhabra, 2009). Prozánětlivé cytokiny a důsledky jejich působení jsou již relativně dobře známy v procesu iniciace a progresu aterosklerotických lézí. Avšak role perivaskulární tukové tkáně (PVAT) v tomto procesu byla dlouhou dobu přehlížena.

PVAT se nachází na vnější straně adventicie bez laminárních struktur nebo jiných organizovaných bariér. Tato tuková tkáň je inervována a s cévou přímo propojena přes *vasa vasorum* (obr. 2). Od ostatních tukových tkání se PVAT liší tím, že má větší množství méně diferencovaných adipocytů, produkujících ve zvýšené míře prozánětlivé cytokiny, jako je IL-6, IL-8 a MCP-1 (monocytární chemoatraktivní protein-1) (Chatterjee et al., 2009). Naopak produkce adiponektinu je v PVAT snížena (Chatterjee et al., 2009).

Objem PVAT lze měřit neinvazivně počítačovou tomografií. Množství PVAT je asociováno s takzvanou viscerální obezitou, mírně koreluje i s množstvím subkutánní tukové tkáně a s indexem tělesné hmotnosti (BMI) (Schlett et al., 2009). Dále její zvýšené ukládání koreluje s inzulinovou rezistencí a to nezávisle na pohlaví a věku (Rittig et al., 2008). Po morfologické stránce je PVAT tvořena tzv. bílou a hnědou tukovou tkání, přičemž jejich zastoupení se v určitých oblastech liší a i výsledky studií nejsou jednoznačné. Některé skupiny vědců došly k závěru, že v PVAT pravé koronární arterie člověka je více zastoupena hnědá tuková tkáň (Sacks et al., 2009), zatímco jiné studie na základě profilu genetické exprese PVAT uvádějí, že v koronárních artériích převažuje bílá tuková tkáň (Chatterjee et al., 2009). Rozdílné výsledky studií mohou být dány jednak odlišnými postupy, nebo faktem, že poměrné zastoupení hnědé a bílé tukové tkáně se může silně individuálně lišit.



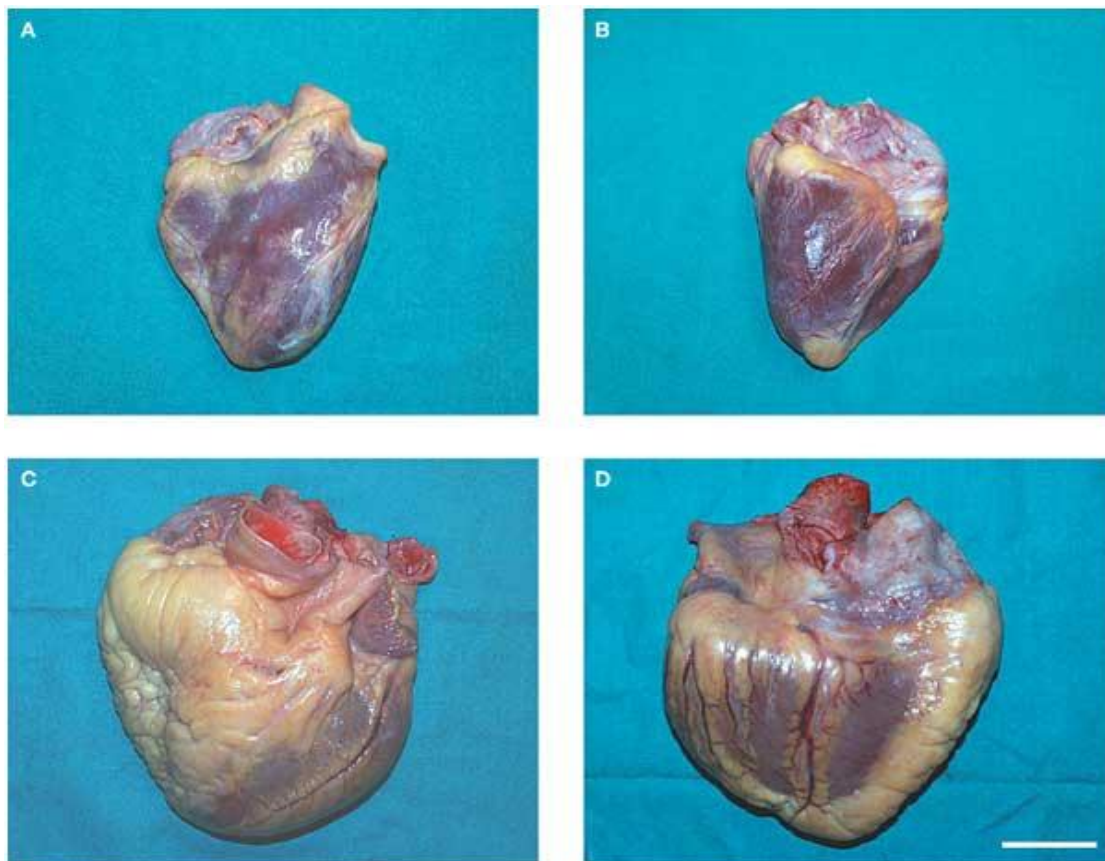
Obr. 2: Struktura cévních vrstev. V PVAT žluté buňky představují adipocyty, červené *vasa vasorum* a modré MF, adipocytové progenitorové/kmenové buňky, lymfocyty, fibroblasty atd. (podle Miao et al., 2012)

Studie dále naznačují, že PVAT má vliv na vaskulární remodelaci. Prostřednictvím produkce řady bioaktivních látek hraje PVAT velmi důležitou roli při proliferaci VSMC a zvyšuje tak tvorbu neointimy (Takaoka et al., 2009). PVAT působí i vasokonstrikčně prostřednictvím produkce superoxidů a následné aktivace tyrosin kinázové a MAPK/ERK kaskády (Gao et al., 2006). PVAT takto přispívá k rozvoji hypertenze asociované s obezitou.

3.1.4 Epikardiální tuková tkáň

Epikardiální tuková tkáň (EAT) je druhem PVAT. EAT se nachází na volné stěně pravé komory, na apexu levé komory, kolem síní a dále jde od povrchu epikardu do myokardu podél adventicie koronárních artérií a jejich větvení viz obr. 3 (Iacobellis et al., 2005). Hypertofie srdce úzce souvisí i s vyšším ukládáním EAT, na rozdíl od ischemie, která ukládání tuku nijak neovlivňuje (Corradi et al., 2004). Obecně na pravé části srdce dochází k vyššímu ukládání EAT. Na pravé komoře je u žen zhruba 0,61 g tuku na gram

svalové tkáně, u mužů to je 0,48 g. Ovšem na levé komoře to je u žen 0,17 g a u mužů 0,15 g tuku na gram svalu (Corradi et al., 2004). Tyto poznatky potvrzují i studie Iacobellis a kolektivu (Iacobellis et al., 2004).



Obr 3: Lokalizace EAT na povrchu srdce (A) anteriorní pohled na normální srdce (210 g); (B) posteriorní pohled na normální srdce (210 g); (C) anteriorní pohled na hypertrofované srdce (900 g); (D) posteriorní pohled na hypertrofované srdce (900 g). Distribuce tuku je limitována atrioventrikulárními a interventrikulárními rýhami nacházejících se podél hlavních koronárních větví (A, B). Měřítka je 4 cm. (Iacobellis et al., 2005).

3.2 Ateroskleróza

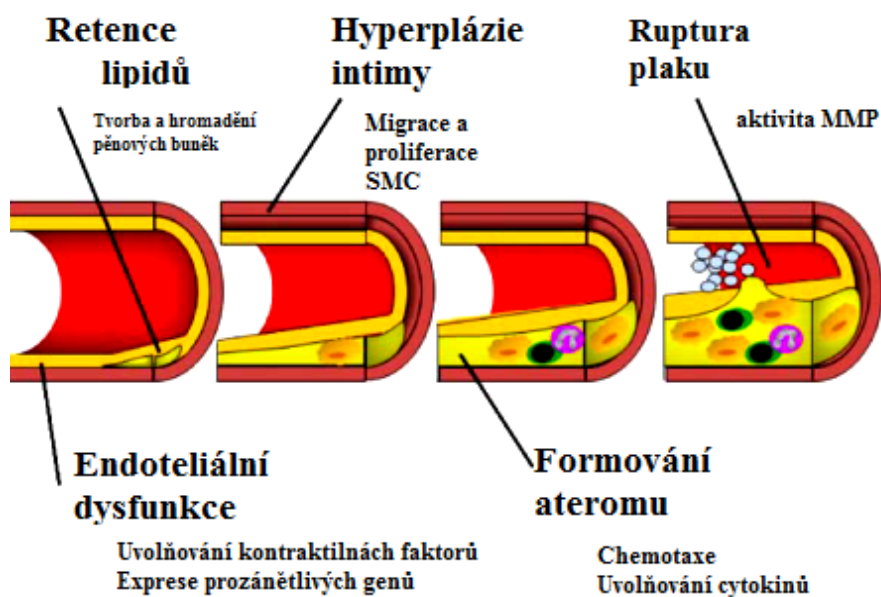
Název pochází z řeckých slov athero (kaše) a skleros (tvrdost). Je charakterizována vznikem a hromaděním aterosklerotických plaků složených z lipidů, nekrotických jader, kalcifikovaných regionů, zanícené hladké svaloviny, endoteliálních buněk, buněk intimy a pěnových buněk (FC) vzniklých z makrofágů a dalších složek plaku (Hansson and Libby, 2006). Ze složení aterosklerotické léze (ateromu) vyplývá, že se na jeho vzniku podílí celá řada mechanismů. Přesný mechanismus vzniku však není stále zcela objasněn. Nejrozšířenější teorie tzv. response-to-injury, předpokládá zapojení

zánětlivých procesů (Yu and Rifai, 2000). Riziko vzniku aterosklerózy je ovlivněno řadou faktorů jako např. body mass indexem (BMI), krevním tlakem, hladinou celkového sérového cholesterolu a cholesterolu v lipoproteinech o nízké hustotě (LDL-C) atd. (Napoli et al., 1997). Ke vzniku a rozvoji ateromu nejčastěji dochází v oblasti koronárních tepen a karotid zásobujících krev srdce a mozek a tepen zásobujících kreví dolní končetiny a ledviny (Stary et al., 1995).

3.2.1 Patogeneze aterosklerózy

Rozvoj aterosklerózy by se dal shrnout a rozdělit do několika bodů. (viz. Obr. 4)

- **Dysfunkce endotelu; vznik tzv. tukových proužků v cévní stěně;** tvorba pěnových buněk
- **Kumulace tukových proužků do počátečních ateromů; hyperplazie intimy.**
- **Tvorba fibroateromu díky zvýšené produkci vaziva; pokračující migrace VSMC do vnitřních oblastí cév a jejich proliferace.** V tomto stádiu již dochází ke komplikacím spojených s nedostatečným krevním zásobením (angina pectoris).
- **Ruptura fibroateromu,** v jehož důsledku dochází ke vzniku trombu a ucpání cév s následnou ischemií zasaženého orgánu
- Všechny fáze rozvoje prolínají zánětlivé procesy, oxidační stres a další faktory.



Obr. 4 Fáze rozvoje aterosklerózy podle (Bäck, 2009)

Obvykle k prvním známkám rozvoje ateromu dochází v místech, kde jsou cévy silněji namáhány, v důsledku čehož může dojít k narušení funkce endotelu a rozvoji zánětlivých ložisek. Endotel tvoří vnitřní výstelku cév. Přestože je tvořen jen jednou vrstvou buněk, je vysoce specializovaný a důležitý pro správné fungování cév. Tvoří důležité rozhraní mezi krví a ostatními vrstvami cév. Endotel produkuje řadu látek ovlivňujících např. cévní tonus, proliferaci buněk hladkého svalstva cév (VSMC), transendoteliální migraci leukocytů, buněčnou adhezi a v neposlední řadě má vliv i na trombolytickou bilanci (Chhabra, 2009). Buňky endotelu se aktivují v důsledku oxidativního stresu způsobeného například: kouřením, dyslipidemií, hypertenzí nebo diabetem (Badimon and Vilahur, 2012; Chhabra, 2009). Aktivované endotelové buňky lokálně produkují řadu růstových faktorů a prozánětlivých cytokinů uplatňujících se v průběhu rozvoje aterosklerózy (Lee and Liles, 2011). Ve zkratce se tyto biologicky aktivní látky podílejí na dějích spojených se zánětlivou reakcí ve stěně cévy a zahrnují např. migraci monocytů do místa zánětu, stimulaci proliferace, fenotypový přesmyk VSMC z kontraktilního na proliferačně-migrační a ukládání kolagenu a jiných proteinů ECM, které vedou k tvorbě fibrózní čepičky (Shah et al., 1995). Přičemž právě ruptura této struktury může vyústit v trombózu. Jak se zdá jsou v tomto procesu zapojeny MMP, jež rozrušují strukturu kolagenu a glykosaminoglykanů (Shah et al., 1995).

První známky rozvoje aterosklerózy začínají ukládáním lipidových depozitů a infiltrací lipidy obsahujících makrofágů do subendoteliálního prostoru velkých cév (Li and Mehta, 2000). Cirkulující monocyty (MC) jsou tvořeny silně heterogenní populací buněk. Infiltrace MC do stěny cév je považován za jeden z iniciálních kroků k dalšímu rozvoji ateromu. Jejich adheze na stěny cév je zprostředkována mimo jiné prostřednictvím např. monocytárního chemostraktivního proteinu (MCP-1) a adhezních molekul, jako je E-selektin, intercelulární adhezní molekuly 1 (ICAM-1) a vaskulární buněčně adhezivní molekuly 1 (VCAM-1) (Li and Mehta, 2000). Monocyty se následně diferencují na dendritické buňky (DC), makrofágy (MF) a pěnové buňky (FC) a podílejí se na fagocytóze jak poškozených buněk a jejich částí, tak i různých látek jako například a například oxidované formy LDL (oxLDL).

V další fázi rozvoje dochází k fenotypovému přesmyku VSMC. Za normální situace se VSMC podílejí na regulaci průsvitu cév a tedy i průtoku krve. Při zánětlivých procesech dochází k přepnutí na proliferační stav, kdy se VSMC buňky množí a migrují do vnitřních vrstev cév (Schachter, 1997; Schwartz, 1997). Výsledkem je hyperplázie intimy spojená i s proliferací fibroblastů a dalším ukládáním lipidů. Studie rovněž přikládaly význam trombocytům a jimi produkováným působkům v patogenezi aterosklerózy (Projahn and Koenen, 2012). Mezi prozánětlivé látky produkované krevními destičkami patří například růstové faktory, lipidy (tromboxany) a ADP (adenosin difosfát) (Dovizio et al., 2014). Účinky tromboxanů, působí vazokonstrikčně a stejně jako ADP podporují agregaci destiček. Růstové faktory stimulují např. dělení fibroblastů, VSMC a řady imunologicky působících buněk podílejících se na růstu ateromu. (Molero et al., 2003).

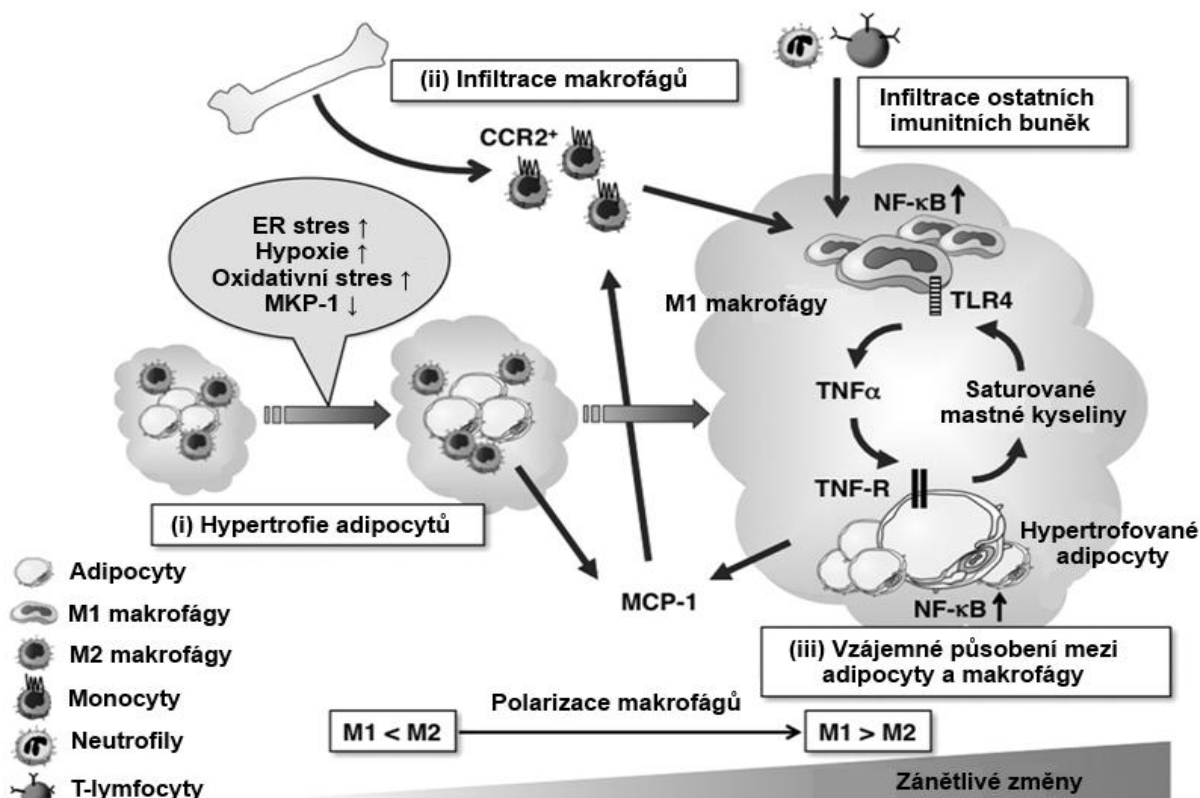
V důsledku ztlustění cévních stěn se v průběhu rozvoje aterosklerózy objevují fyzicky znatelné problémy, jako je angína pectoris, kdy dochází k nedostatečnému zásobení srdce krví, potažmo nedostatečnému okysličení. K tomu dochází v důsledku nedostatečné průchodnosti koronárních tepen. Případně může dojít k úplnému zneprůchodnění, jako v případě infarktu myokardu, kdy po ruptuře aterosklerotického plaku dojde k vytvoření trombu a následnému ucpání cévy majícího za následek vznik ischemie v místě zásobení.

Ač se může zdát, že jsou mechanismy vzniku a rozvoje choroby jsou dostatečně známy, není tomu tak. Stále se objevují nové informace vedoucí k objasnění vzniku a rozvoje onemocnění.

3.2.1.1 Zánětlivé procesy

Zánětlivé procesy prolínají celý proces tvorby aterosklerotického plaku a akcelerují jej. V počátečních fázích hrají důležitou roli působky, jako je např. C-reaktivní protein (CRP), nebo MCP-1, které mohou být produkovány řadou buněčných typů včetně neimunitních buněk cév. Tyto látky spolu s adhezivními molekulami atrahují monocyty, jež dále zvyšují produkci prozánětlivých látek, diferencují se a dále produkují prozánětlivé cytokiny. Tyto cytokiny se podílejí na remodelaci vaskulárních buněk a expresi vzor rozpoznávajících receptorů (PRR), včetně scavengerových receptorů a Toll-like receptorů (TLR). PRR receptory makrofágů slouží k fagocytóze mikroorganismů a v tomto případě se uplatňují při fagocytóze oxLDL. V důsledku čehož může docházet k transformaci MC na FC. OxLDL v pozdní fázi diferenciacie monocytů vede k produkci fenotypově zralých DC. To přispívá k zapojení specifické imunity do rozvoje aterosklerózy (Perrin-Cocon et al., 2001). MF a adipocyty na sebe vzájemně mohou působit, aktivovat se a indukovat prozánětlivý fenotyp viz obr. 5.

V neposlední řadě jsou to krevní destičky (trombocyty) podílející se na zánětlivých procesech v cévách. Mimo to jsou velice důležité pro hemostatické procesy a při formování trombu. Produkují řadu mediátorů ovlivňujících okolní buňky, hlavně leukocyty, které pak mohou aktivovat. Patří mezi ně P-selektin, jenž může být považován za marker aktivace trombocytů, potažmo možných vaskulárních komplikací (Kisucka et al., 2009). Zvyšuje koagulační aktivitu indukci leukocyty derivovaných mikropartikulí a také aktivitu integrinů produkovaných leukocyty (Kisucka et al., 2009). Zvyšuje i kalcifikaci plaku (Burger and Wagner, 2003). Trombin produkováný trombocyty aktivuje další buňky a stimuluje produkci dalších cytokinů jako např. IL-1 aktivovanými MF (Jones and Geczy, 1990), nebo stimuluje degranulaci a produkci histaminu u žírných buněk (Razin and Marx, 1984).



Obr. 5 Znázornění zánětlivých procesů v TT. V raných stádiích obezity dochází k hypertrofii adipocytů z důvodu přejídání (i). Nedávné důkazy naznačují, že zvýšené metabolické napětí, jako je ER stres, hypoxie a oxidativní stres snižují aktivitu MKP-1 (MAPK fosfatáza 1), které se podílí na indukcii zánětlivých změn v adipocytech během jejich hypertrofie. V pokročilých stádiích obezity různé druhy stromálních imunokompetentních buněk (neutrofilý, T-lymfocyty, MF) infiltrují TT obézních jedinců (ii), čímž zvyšují zánětlivé změny prostřednictvím vzájemného působení adipocytů a makrofágů (iii). Například makrofágy produkovaný TNF- α indukuje uvolňování nasycených mastných kyselin z adipocytů lipólýzou a volné mastné kyseliny působí na MF prostřednictvím TLR4. Takto se může vytvořit smyčka indukující zánětlivé procesy v MF. Vzájemné působení MF a adipocytů se tak dále upevňuje a zánět se zhoršuje. Nedávné důkazy také poukazují na různorodost MF v TT. MF mohou být aktivovány klasickou cestou na M1 MF (prozánětlivé), nebo alternativní cestou aktivované M2, působící spíše protizánětlivě. Infiltrující MF vykazují fenotypové změny ve směru z M2 na M1 u obézní TT, čímž se zánětlivé kaskády akcelerují. TNF-R – TNF receptor, CCR2 – C-C chemokinový receptor typ 2 (receptor pro MCP-1) (Suganami and Ogawa, 2010)

Všechny tyto ale i další buňky různých typů působí prostřednictvím produkce a uvolňování řady cytokinů. VSMC a endoteliální buňky produkují TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 a IL-15, endoteliální buňky navíc produkují i IL-3, GM-CSF, G-CSF a M-CSF stimulující proliferaci hematopoetických buněk (Tedgui and Mallat, 2006). MF produkují velkou řadu cytokinů a chemokinů. Mezi prozánětlivé jimi produkované cytokiny se řadí TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, a IL-18 a protizánětlivé IL-10, TGF- β a IL-32, relativně nedávno

objevený cytokin působící prostřednictvím NF- κ B a p38 MAP kinázové kaskády (Kim et al., 2005). Mezi chemokiny jimi prodované můžeme zařadit MCP-1, MCP-4, IL-8, migraci inhibující faktor a další (Weber et al., 2004).

3.2.2 Rizikové faktory

Rizikovými faktory aterosklerózy označujeme určité charakteristiky spojené s vyšším rizikem vzniku a rozvoje onemocnění. Rizikové faktory aterosklerózy je možné z praktického hlediska rozčlenit na rizikové faktory ovlivnitelné a neovlivnitelné. Neovlivnitelné rizikové faktory jsou takové, se kterými se jedinec rodí, nebo k nim v průběhu života dospěje. Mezi takovéto faktory lze řadit například věk, pohlaví nebo rodinný výskyt předčasného aterosklerotického onemocnění.

Existuje však celá řada rizikových faktorů, které ovlivnit lze. Mezi nejdůležitější ovlivnitelné faktory patří zejména: porucha metabolismu tuků (hyperlipoproteinémie), oxidativní stres způsobený kouřením cigaret, hypertenze nebo diabetes.

Stručnou charakteristikou a významem některých rizikových faktorů pro vznik a rozvoj aterosklerózy se budeme věnovat v následujícím textu.

3.2.2.1 Oxidační stres

Oxidační stres je podmíněn přítomností zvýšeného množství škodlivých kyslíkových radikálů (ROS). Za normálních okolností jsou ROS z těla rychle eliminovány účinkem antioxidačních systémů. Vlivem rizikových faktorů, jakými jsou kouření, obezita, hypercholesterolémie, nedostatek pohybu, přítomnost metabolického syndromu nebo stárnutí, jsou účinky antioxidačních systémů těla oslabeny. Čím více rizikových faktorů se uplatňuje, tím je větší pravděpodobnost, že kardiovaskulární systém bude poškozen volnými radikály.

Řada studií prokázala, že právě oxidační stres se významně podílí na vzniku aterosklerózy. ROS zprostředkovávají různé signální dráhy, které jsou základem zánětu cév v aterogenezi od zahájení vývoje lipidových pásů, přes tvorbu lézí až ke konečné ruptuře plátu (Madamanchi et al., 2005). Významná je zejména oxidace LDL částic podrobněji zmíněná v části textu věnovaném lipoproteinům.

3.2.2.2 Lipoproteiny

V krevním oběhu se nachází řada typů lipidových struktur. Lipoproteiny jsou makromolekulární sloučeniny proteinů s navázanou lipidovou složkou, jejichž hlavní funkcí je transport ve vodě nerozpustných lipidů krví. Lipoproteiny lze rozdělit podle řady hledisek. Například podle obsahu lipidů, který přímo určuje jejich hustotu, lze lipoproteiny rozdělit do pěti základních frakcí: na lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL), lipoproteiny se střední hustotou (IDL), lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL), lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL) a lipoproteiny s velmi vysokou hustotou (VHDL nebo též chylomikrony). Jednotlivé frakce se liší svou úlohou při transportu lipidů. Stanovení lipoproteinových frakcí v krevní plasmě má pak velký význam pro diagnostiku řady chorob.

LDL (low density lipoprotein) zvyšuje progresi onemocnění a bývá považován za rizikový faktor pro rozvoj kardiovaskulárních chorob (Badimon and Vilahur, 2012). Zejména v oxidovaných formách (oxLDL) hraje kritickou roli v iniciaci, progresi a stabilitě aterosklerotického plaku a to prostřednictvím makrofágů, jež tyto molekuly fagocytují a stávají se pěnovými buňkami. Oxidovaný LDL se však také uplatňuje jako signální molekula v rozvoji zánětu (Shao et al., 2012).

Naopak HDL (high density lipoprotein) je považován za antiaterogenní. Studie prokázaly, že čím nižší je hladina HDL, tím vyšší je riziko rozvoje aterosklerózy a hemoragických příhod (Badimon and Vilahur, 2012). Měření hladiny HDL-cholesterolu v krvi je proto velmi důležité pro posouzení celkového rizika vzniku aterosklerózy. Hladinu HDL-cholesterolu významně snižují známé proaterogenní rizikové faktory zmíněny již dříve. Hladina HDL-cholesterolu je ovlivněna hladinou estrogenu a je tedy vyšší u žen než u mužů. To je také jeden z důvodů, proč se kardiovaskulární onemocnění u žen vyskytují až po menopauze a ve vyšším věku než u mužů (Ahmad et al., 2013).

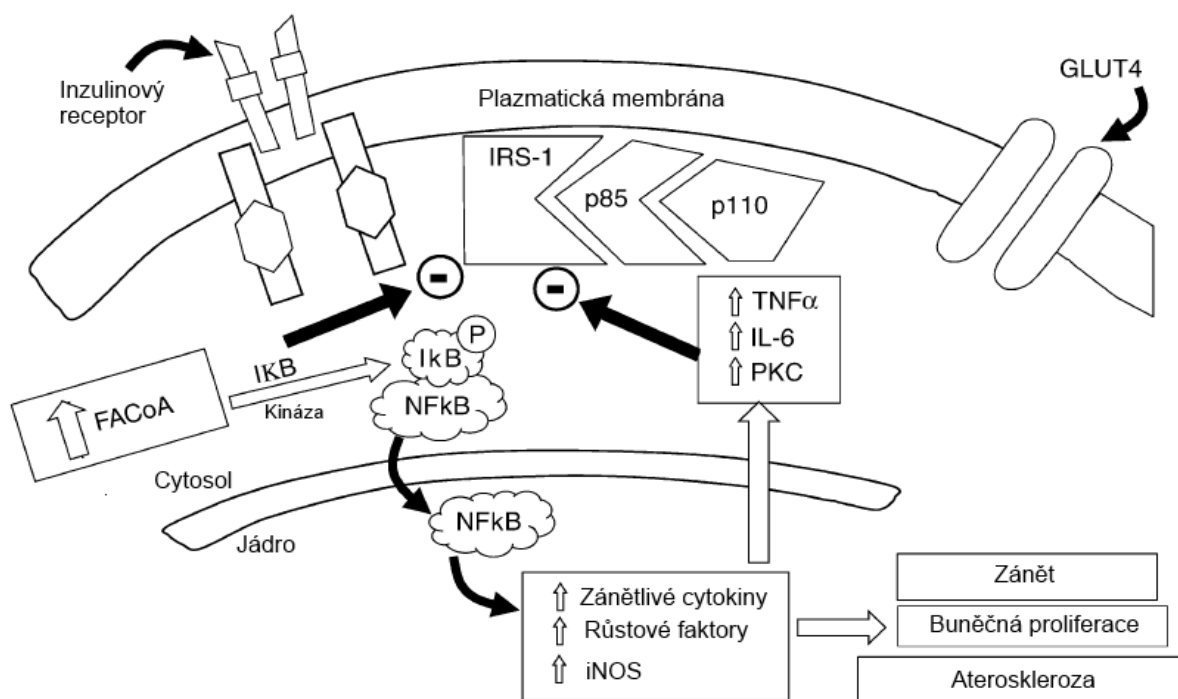
Jak LDL, tak HDL patří mezi lipoproteiny bohaté na cholesterol. Při posuzování hladiny krevních lipidů na míru rizika rozvoje aterosklerózy je však poměr mezi celkovým cholesterolem a HDL-cholesterolem lepším ukazatelem rizika, než hladina celkového cholesterolu.

3.2.2.3 Diabetes

Diabetes vzniká v důsledku nedostatku inzulinu nebo jeho nedostatečné účinnosti. Onemocnění je charakterizováno zejména přítomností hyperglykémie. Jedná-li se o diabetes 1. typu, jehož podstata je autoimunitní, slinivka inzulin neprodukuje nebo jej produkuje v omezeném množství, neboť vlastní imunitní systém sám ničí beta-buňky. V případě častěji se vyskytujícího diabetu 2. inzulin slinivkou produkován je, ale citlivost tkání těla k tomuto inzulinu je snížena.

Závažnost diabetu jako rizikového faktoru pro vznik aterosklerózy je dána i tím, že současně s diabetem se obvykle vyskytují i další rizikové faktory jakými jsou například obezita, hypertenze, zvýšený oxidační stres nebo dyslipidemie. Hyperglykémie způsobuje mimo jiné oxidační stres zvýšenou produkcí ROS a zvyšuje neenzymatickou glykaci proteinů (Brownlee, 2001, 2000; Wolff et al., 1991). Glykace způsobuje změny vlastností proteinů, což poškozuje tkáně včetně cév pojivové tkáně. Inzulinová rezistence přítomná u diabetu typu 2. pak rovněž úzce souvisí s hypertenzí, obezitou (zejména viscerální), dyslipidemií (vysoké hladiny triglyceridů, nízké HDL), endoteliální dysfunkcí a hyperinzulinémií (DeFronzo, 2010). Diabetes 2. typu mimo jiné ovlivňuje s produkcí adipokinů. Adiponektin snižuje incidenci diabetu, naopak prozánětlivé látky produkované TT při obezitě, jako je IL-6 nebo TNF- α zvyšují inzulinovou rezistenci a potencují rozvoj diabetu (DeFronzo, 2010; Luft et al., 2013).

Jak diabetes typu 1, tak diabetes typu 2 vyvolávají chronický zánět podílející se na rozvoji aterosklerózy (Luft et al., 2013; Stehouwer et al., 2002). Dokonce i dlouhodobě mírně zvýšené hodnoty glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}) u osob bez diabetu, akcelerují rozvoj aterosklerózy (Drong et al., 2012). Možný mechanismus, jakým mohou dislipidemie a hypercholesterolemie spolu s inzulinovou rezistencí přítomné při diabetu přispívat ke vzniku zánětlivých procesů je zobrazen na obr. 6 (Kanter et al., 2007; Renard et al., 2004).



Obr. 6: Možný mechanismus působení dislipidemie, hypercholesterolemie a inzulínové rezistence na vznik zánětlivých procesů. Volné mastné kyseliny navázané na koenzymu A (FACoA) aktivují IκB kinázu (IKK), která sama o sobě inhibuje působení IRS-1, potažno inzulínem aktivovanou signální kaskádu. Zároveň dochází v důsledku působení IKK k fosorylaci a tím inaktivaci IκB a tím aktivaci NFκB, který se dostává do jádra a působí jako transkripční faktor pro zánětlivé cytokiny, růstové faktory a iNOS. Produkty těchto genů také zpětnovazebně ovlivňují IRS-1, čímž prohlubují inzulínovou rezistenci. Expresí prozánětlivých genů a růstových faktorů dochází k rozvoji zánětu a buněčné proliferace, jež přispívají k ateroskleróze. Převzato z (DeFronzo, 2010)

Je známo, že diabetes přispívá k rozvoji dysfunkce endotelu. Vlivem diabetu dochází ke zvýšené expresi endoteliálních VCAM-1 (adhezivní molekuly buněk cév 1), P-selektinu a E-selektinu a VCAM-1 a ICAM-1 (intracelulární adhezivní molekuly 1) v hladké svalovině intimy (Booth et al., 2002; Le et al., 2013; Ribau et al., 1999). Zvýšená exprese adhezivních molekul přispívá ke zvýšené infiltraci MF a lymfocytů, které dále stimulují zánět a růst ateromu (Renard et al., 2004). K rozvoji dysfunkce endotelu přispívá rovněž fakt, že hyperglykémie spolu s ROS inhibuje ERK-5 (extracelulární signálem regulovaná kináza) prostřednictvím aktivace p90RSK (p90 ribozomální S6 kináza) (Le et al., 2013) ERK-5 snižuje expresi adhezivních molekul a adhezi imunokompetentních buněk k povrchu endotelu (Le et al., 2013). Vysoké hladiny cukru v krvi dále mimo jiné vyvolávají zvýšenou PKA-dependentní fosorylaci Hsp90α (heat shock protein 90 α), v důsledku čehož dochází ke snížení aktivity eNOS (Lei et al., 2007).

Hyperglykemie tak působí snížení produkce NO endotelem. NO v cévách působí silně vasorelaxačně, inhibuje chemotaxi leukocytů a adhezi trombocytů (Napoli et al., 2006).

3.2.2.4 Hypertenze

Hypertenzí je označován stav, kdy je dlouhodobě zvýšený krevní tlak nad 140/90 mmHg. Jedná se o velmi komplexní onemocnění vyvolané řadou mechanismů. Vysoký krevní tlak způsobuje zvýšené napínání cév, v důsledku čehož dochází k namáhání endotelu vyvolávající jeho dysfunkci a rozvoj zánětu. Jak je již zmíněno výše, dysfunkce ET indukuje změny v produkci bioaktivních látek ovlivňujících cévní tonus, proliferaci VSMC, migraci leukocytů v důsledku produkce adhezivních molekul a produkci řady prozánětlivých cytokinů (Badimon and Vilahur, 2012; Chhabra, 2009; Lee and Liles, 2011).

Proaterogenně působí rovněž oba důležité mechanismy podílející se na rozvoji hypertenze - tj. renin-angiotenzinový systém (RAS) a endotelinový systém (ET) (Dhaun et al., 2008; Rautureau and Schiffrin, 2012; van Vark et al., 2012). ET systém je tvořen třemi účinnými vasokonstričními peptidy, ET-1, ET-2 a ET-3, působícími prostřednictvím receptorů spřažených s G-proteiny, ETA a ETB receptory (Gomez Sandoval et al., 2014). Hladiny ET-1 v plazmě korelují s mírou rozvoje aterosklerózy (Lerman et al., 1991). ET-1 zvyšuje fibrotizaci cév skrze zvýšenou expresi růstového faktoru pro pojivové tkáně (CTGF). Mimo to se ET-1 podílí na zvýšené proliferaci a migraci VSMC skrze stimulaci produkce PDGF (Gomez et al., 2007; Yang et al., 1999) a stimulaci aktivity některých matrixových metalo proteáz (MMP) (Felx et al., 2006; Wu et al., 2012).

Systém RAS úzce souvisí s poruchami ledvin; ledviny jako odpověď na nedostatek tekutin zvyšují produkci reninu, který rozštěpí a aktivuje angiotensinogen na angiotensin I (Ang I). Ang I je dále prostřednictvím angiotensin-konvertujícího enzymu, případně chymázy, měněn na aktivnější Angiotensin II (Ang II) působící prostřednictvím AT₁ a AT₂ receptorů (Taal and Brenner, 2000). Ang II stejně jako ET-1 zvyšuje produkci CTGF (Rodriguez-Vita et al., 2005). Navíc RAS snižuje produkci adiponektinu (Furuhashi et al., 2003). Ang II pak rovněž vyvolává zvýšení oxidačního stresu produkcí ROS, zvyšuje proliferaci VSMC (Li et al., 2010; Song et al., 2013), podílí na zvyšování produkce adhezivních molekul VCAM-1 v buňkách cév (Tummala et al., 1999) a změnách v produkci chemokinů (Gu et al., 1998) a cytokinů jako např. IL-8

(Brasier et al., 2000; Guo et al., 2011; Kim et al., 2008). Výsledkem je rozvoj dysfunkce endotelu a VSMC. Ang II ovlivňuje také produkci MMP-2 čímž může destabilizovat aterosklerotický plát (Walter et al., 2008). V klinice praxi se pro blokování RAS využívají často inhibitory angiotensin-konvertujícího enzymu (ACE) (Rutherford et al., 1994; Yusuf et al., 1992). U experimentů na modelových zvířatech bylo prokázáno, že inhibitory ACE značně snižují aterogenezi (Hayek et al., 1999, 1998; Charpiot et al., 1993; Chobanian et al., 1990).

3.2.2.5 Pohlavní hormony

Několik studií prokázalo, že androgeny *in vivo* i *in vitro* zvyšují expresi proaterogenních faktorů (McCrohon et al., 1999; Nheu et al., 2011). Na druhou stranu se ukazuje, že i nízké endogenní hladiny testosteronu jsou spojeny s aterosklerózou karotid u mužů ve středním věku, a že tento vztah je nezávislý na tradičních rizikových faktorech kardiovaskulárních onemocnění (Mäkinen et al., 2005; Muller et al., 2004).

Naopak estrogeny jsou považovány za protektivní v rozvoji kardiovaskulárních chorob. Estrogeny snižují progresi aterosklerózy částečně prostřednictvím změn v plazmatických lipidech a lipoproteidech, jak již bylo dříve zmíněno. U postmenopauzálních žen může estrogenová terapie předcházet rozvoji aterosklerózy (Hodis et al., 2001), avšak u rozvinuté choroby již nemá takový význam (Hodis et al., 2003). Dalším z pozitivních aspektů estrogenů je jejich schopnost redukovat proliferaci VSMC, jež je velmi zásadní v rozvoji aterosklerózy a restenózy (Ueda et al., 2013).

3.3 Role VSMC v rozvoji aterosklerózy

Funkční role VSMC v ateroskleróze zahrnují: (1) fenotypový přesmyk (z kontraktilního fenotypu na syntetický stav), migrace a proliferace; (2) tvorbu extracelulární matrix; (3) exprese prozánětlivých genů a oxidační stres.

3.3.1 Fenotypový přesmyk, migrace a proliferace

Řada studií prokázala význam fenotypového přesmyku VSMC pro rozvoj aterosklerózy (Davis-Dusenbery et al., 2011; Wang et al., 2009). V medii mají VSMC kontraktilní funkci a jsou důležité pro regulaci tonu cév. Za určitých okolností však může docházet k fenotypovému přesmyku z kontraktilního na proliferativní fenotyp,

kdy buňky začnou migrovat do intimy, kde proliferují a podílí se na produkci extracelulární matrix a tvorbě fibrózní čepičky (Ross, 1999). Během fenotypového přesmyku se mění i genová exprese VSMC díky čemuž jsou pak do prostředí uvolňovány látky působící chemoatraktivně na jiné buněčné typy.

Řada adipokinů uvolňovaných TT ovlivňuje proliferaci a migraci VSMC a v kombinaci s volnými mastnými kyselinami se rizika spojená s VSMC dysfunkcí ještě zhoršují (Lamers et al., 2011). Naopak adiponektin (u obézních jedinců je produkován v nižším množství) proliferaci VSMC snižuje a působí antiaterogenně.. Jedním z proaterogenních adipokinů ovlivňujících migraci a proliferaci VSMC je VEGF (Grosskreutz et al., 1999). MCP-1 pak působí chemoatraktivně nejen na imunokompetentní buňky, ale i na VSMC a stimuluje jejich migraci (Ma et al., 2007). Podobně jako MCP1, i IL-8 působí v konečném důsledku jako mitogen VSMC (Yue et al., 1994). Proliferaci VSMC však ovlivňuje i celá řada dalších buněčných produktů např. růstový faktor fibroblastů-2 (Lewis et al., 2001), ET-1 potenciovaný Ang II a serotoninem (Watanabe et al., 2001). V neposlední řadě proliferaci a migraci stimulují parakrinně působící látky uvolňované ve větší míře z apoptotických VSMC (Yu et al., 2011). Dysfunkční VSMC rovněž zvyšují produkci adhezních molekul, jako je ICAM-1, VCAM-1, fractalkine interagujícími s monocyty (Lamers et al., 2011).

Dalším významným stimulátorem jak migrace, tak i proliferace VSMC je oxidovaný HDL (ox-HDL). Ox-HDL indukuje oxidázovou aktivitu NADPH a produkci ROS. Inhibice této aktivity a produkce ROS snižuje i proliferaci a migraci VSMC. (Wang et al., 2013). V proliferaci, i v migraci VSMC ovšem hraje důležitou roli např. i PDGF (Kohno et al., 2013; Usui et al., 2013).

3.3.2 Tvorba extracelulární matrix

Více než polovina aterosklerotického plaku je tvořena právě extracelulární matrix (ECM). Tvoří ji většinou kombinace makromolekul, jako je kolagen, proteoglykany, elastin, laminin, fibronectin, vitronectin a trombospodin. Každá z těchto komponent se vyznačuje svou strukturní vlastností, jež determinuje její roli v rozvoji plaku. Navíc se ECM uplatňuje při migraci, proliferaci a diferenciaci buněk.

ECM je mimo jiné produkován aktivovanými formami VSMC (Galis and Khatri, 2002). Při apoptóze VSMC v důsledku zánětu, nebo jiného poškození, dochází ke zvýšené produkci kolagenu v živých VSMC prostřednictvím parakrinního působení látek uvolňovaných apoptotickými buňkami (Yu et al., 2011). Při dysfunkci endotelu může docházet ke snížení produkce NO, což vyvolává zvýšenou tvorbu kolagenu I a III ve VSMC (Myers and Tanner, 1998). Také působení TGF- β zvyšuje tvorbu ECM ve VSMC (Rasmussen et al., 1995). Fibrotizace je úzce spojována s hypertenzí. Cévy jsou jednak namáhány zvýšeným prouděním krve a dochází tak k aktivaci VSMC a endotelu a pak je produkce ECM ovlivněna i prostřednictvím Ang II a ET-1 (Ammarguella et al., 2002; Newby, 2005; Touyz, 2005). Ang II působí mimo jiné skrze stimulaci tkáňových inhibitorů MMP, v důsledku čehož dochází ke snížení aktivity MMP a vyšší fibrotizaci (Castoldi et al., 2003).

Matrixové metalo proteázy (MMP) produkovány SMC a MF jsou endopeptidázy, které naopak odbourávají a remodelují ECM. MMP se v buňkách cév vyskytuje asi 26 typů (Louis and Zahradka, 2010). Vlivem působení MMP může docházet až k rupturám plaku, tvorbě trombu a následnému ucpání cév. Produkce MMP se rovněž ovlivňuje migraci VSMC (Wang et al., 2004; Yao et al., 2004). Podobně jako u produkce ECM, i k jejímu odbourávání prostřednictvím MMP dochází během zánětlivých procesů a v důsledku autokrinního a parakrinního působení bioaktivních látek (Shah et al., 1995). Ke zvýšené produkci MMP-1, -3 a -9 dochází působením prozánětlivých látek na VSMC, jako je IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α nebo růstové faktory VEGF a PDGF (Kusano et al., 1998; Lee et al., 1995; Wang and Keiser, 1998). Produkce dalších MMP je zvyšována působením např. ET-1 (Felx et al., 2006; Wu et al., 2012).

MMP se mohou podílet i na přepnutí VSMC do proliferativního stavu prostřednictvím narušení bazální membrány, na kterou diferencované VSMC nasedají. VSMC a mohou proliferovat a migrovat do intimy. Navíc narušením kompaktní struktury ECM dochází k ukládání lipidů do těchto membrán a tím i k progresi nemoci (Newby, 2005). Některé MMP dokonce sami o sobě produkují volné kyslíkové radikály, jež dále narušují okolní struktury (Rajagopalan et al., 1996).

3.3.3 Exprese prozánětlivých genů a oxidační stres

Běžně v nijak nepozměněných buňkách hladkého svalstva cév nedochází k zásadní expresi genů prozánětlivých látek ani významné produkci kyslíkových radikálů způsobujících oxidační stres. V důsledku porušení cév mechanicky, či zánětlivým procesem dochází k indukci apoptózy nebo jiné formě buněčné smrti. VSMC při apoptóze způsobené prostřednictvím Fas – FasL interakce dochází k indukci exprese genu pro MCP-1 a IL-8, který se mimo jiné také funguje jako chemoatraktant pro masivní imigraci makrofágů (Schaub et al., 2000).

Také vzrůstající věk a s ním související vzrůstající míra oxidačního stresu je důležitým faktorem indukujícím produkci řady prozánětlivých cytokinů. S věkem se zvyšuje sekrece prozánětlivých cytokinů jako jsou např. MCP-1, TNF α , IL-6, IL-1 β (Csiszar et al., 2012) nebo IL-1 α (Yu et al., 2011).

3.4 Látky produkované tukovou tkání

Jak je již v předchozích kapitolách zmíněno, tuková tkáň produkuje řadu biologicky aktivních látek. Tyto látky mohou ovlivňovat řadu procesů jako například glukózový metabolismus (adiponektin, rezistin, atd.), metabolismus lipidů (lipoproteinová lipáza, perilipin, atd.), zánět (adiponektin, MCP-1, TNF sloha, IL6, atd.), krevní tlak (angiotenzinogen, angiotenzin II) a další děje (Hajer et al., 2008). Kromě modulace zánětu mohou adipokiny rovněž ovlivňovat migraci a proliferaci VSMC a přispívat tak k rozvoji proliferativních cévních onemocnění (Lamers et al., 2011; Schlich et al., 2013). Následující text je zaměřen na stručné přiblížení některých významných adipokinů.

3.4.1 Interleukin – 6

Interleukin – 6 (IL-6) je multifaktoriální prozánětlivý cytokin, který má v glykosylované formě 21 - 28 kDa a obsahuje typický svazek čtyř helixů, charakteristický pro celou IL-6 rodinu cytokinů (Scheller et al., 2011). Uplatňuje se jako významný faktor akutní fáze. IL6 je sekretován mnoha buněčnými typy včetně imunitních buněk, fibroblastů, buněk endotelu, kosterních svalů nebo tukové tkáně. (Mohamed-Ali et al., 1998). Jeho produkce je přísně regulována, ale přesto je v nízkých hladinách exprimován i u zdravých jedinců (Abeywardena et al., 2009). Zvýšená hladina

IL-6 je asociovaná s řadou chorob spojených s chronickým zánětem, jako je ateroskleróza, infarkt myokardu nebo diabetes 2. typu (Abeywardena et al., 2009). U obézních jedinců je IL6 produkován ve zvýšené míře, avšak zhubnutím lze hladiny IL-6 účinně snižovat (Manco et al., 2007). Samotný IL-6 může zvyšovat infiltraci tukové tkáně MF a ukládání lipidů do TT prostřednictvím aktivace MAPK kaskád (Zhang et al., 2012).

3.4.2 Interleukin – 8

Interleukin – 8 (IL-8) patří mezi chemoatraktivní cytokiny. Má nízkou molekulovou hmotnost, kolem 8 kDa. Typicky je produkován v zánětlivých ložiscích, kam atrahuje imunokompetentní buňky. Dochází tak k jejich koncentrování v místě zánětu (Schaub et al., 2000).

IL-8 přenáší svůj signál do buňky prostřednictvím receptorů spřažených s trimerními G-proteiny. G-proteiny aktivované kaskády zvyšují permeabilitu cév, shlukování E-selektinů, takže dochází k adhezi imunokompetentních buněk, hlavně monocytů, na stěny cév (Schraufstatter et al., 2001). Toto je jedna z možností jak může IL8 přispívat k růstu ateromu. Ke zvýšené produkci IL-8 dochází také v důsledku působení oxLDL na endotel cév a VSMC a v důsledku působení Ang II (Kim et al., 2008; N'Guessan et al., 2009; Ryoo et al., 2004).

Produkce IL-8 je vyšší spíše u obezity abdominální, kde je zvýšené množství viscerálního tuku (Bruun et al., 2004). Vzhledem k tomu, že je uvolňován do plazmy, lze ho použít jako relativně snadno sledovatelný marker pro kardiovaskulární choroby.

3.4.3 Monocytární chemoatraktivní protein – 1 (MCP-1)

Podobně jako IL-8 i MCP-1 patří do rodiny chemokinů. Spojují je tedy některé vlastnosti jako je částečná podobnost v aminokyselinovém řetězci, nízká molekulová hmotnost, nebo jak z názvu vyplývá schopnost atrahovat další buňky do místa zánětu. Je produkován řadou typů tkání, včetně tukové. Ve větší míře je produkován ve viscerální TT ve srovnání se subkutánní TT. Některé práce pak nasvědčují, že produkce MCP1 v TT může být spojena spíše s infiltrací a produkcí

MCP-1 v makrofázích, než aby množství MCP-1 záviselo na množství tukové tkáně jako takové (Bruun et al., 2005).

MCP-1 působí výrazně proaterogenně. Jeho role chemoatraktantu pro monocyty je v počátečních fázích rozvoje aterosklerózy klíčová. Studie Boring a kolektivu pak prokázala úlohu MCP1/CCR2 dráhy pro velikost aterosklerotické léze (Boring et al., 1998). Blokace této dráhy je důležitá pro prevenci rozvoje aterosklerózy.

3.4.4 Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF)

Původně byl popsán jako důležitý růstový faktor pro angiogenezi nezbytnou pro růst tumorů, později se však ukázalo, že se podílí i na dalších chorobných stavech cév (Leung et al., 1989; Senger et al., 1983). VEGF působí proaterogenně a participuje rovněž na dějích souvisejících s angiogenezi, arteriogenezi, cerebrálním edémem, neurogenezí nebo postischemických reparacích po cévních, srdečních a mozkových ischemiích (Greenberg and Jin, 2013).

VEGF indukuje proliferaci endoteliálních buněk, zvyšuje buněčnou migraci a inhibuje apoptózu (Neufeld et al., 1999). Snižuje riziko trombo-embolických událostí (Ropert et al., 2011). Zvyšuje zrání MF v kostní dřeni a jejich uvolňování do periferní krve a urychluje ukládání aterosklerotických plaků v cévách (Celletti et al., 2001). Zvyšuje produkci NO (Kroll and Waltenberger, 1999), což na jednu stranu působí vasorelaxačně, na druhou stranu je však NO silným oxidačním činidlem.

Vliv VEGF na kardiovaskulární choroby je stále diskutován. Některé práce podporují teorii, že VEGF urychluje destabilizaci plaku (Celletti et al., 2001; Lam et al., 2013; Papalambros et al., 2004), jiné práce naopak podporují tvrzení, že VEGF stabilitu plaku zvyšuje (Waltenberger, 2009).

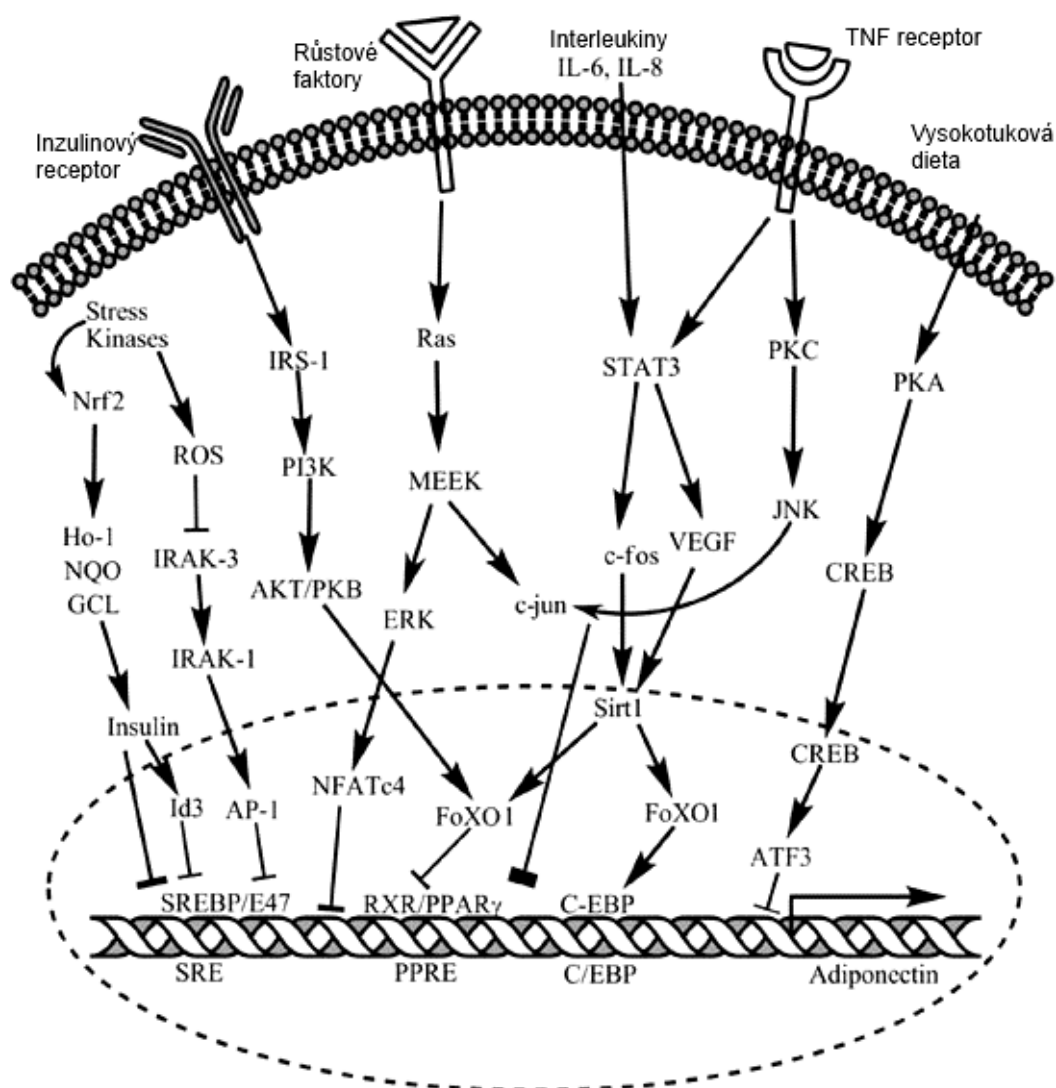
3.4.5 Adiponektin

Relativně nedávno objevený 30kDa Acrp30 je sekretovaný eksklusivně maturovanými adipocyty. Původně byl objeven u hibernantů, jakožto důležitý regulátor příjmu potravy (Scherer et al., 1995). Později byl přejmenován na adiponektin. Již od počátku bylo zřejmé, že adiponektin je důležitý regulátor metabolismu sacharidů

a lipidů (Scherer et al., 1995). Adiponektin zvyšuje inzulinovou senzitivitu. Přičemž existuje souvislost mezi hladinou adiponektinu, mírou obezity a inzulinovou rezistencí (Scherer et al., 1995).

Na rozdíl o řady jiných adipokinů dochází k jeho snížení u obézních jedinců. Nízké hladiny korelují s vyšším rizikem rozvoje kardiovaskulárních chorob a metabolického syndromu. Při hubnutí se hladina adiponektinu naopak zvyšuje (Bahia et al., 2006; Matsuzawa et al., 2004). Adiponektin působí převážně protiaterogenně, (Goldstein and Scalia, 2004), protizánětlivě a jeho hladina negativně koreluje s rozvojem diabetu (Matsuzawa, 2005). Jeden z mechanismů, jimiž působí protizánětlivě je blokování signalizační kaskády TNF- α aktivující NF κ B skrze cAMP dependentní dráhu (dochází k inhibici fosforylace I κ B) (Ouchi et al., 2000). Mezi další mechanismy protiaterogenního působení je inhibice syntézy IL-8 (Kobashi et al., 2005) nebo snížení tvorby pěnových buněk snížením vychytávání lipidů makrofágy (Ouchi et al., 2001).

Jak je na schématu (Obr. 7) vidět, exprese adiponektinu je inhibována prozánětlivými faktory. Produkce adiponektinu se mimo jiné liší i v závislosti na pohlaví, ženy mají vyšší hladiny adiponektinu než muži (Maeda et al., 1996).



Obr. 7: Schéma regulace exprese adiponektinu. Expresi adiponektinu je blokována řadou prozánětlivých procesů a signalizací stimulovaných mediátory jako je $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-18. Tyto inhibiční kaskády vedou přes JNK a ERK1/2 dráhy, které mají hlavní roli v regulaci exprese adiponektinu. Oxidační stres inhibuje expresi IRAK-3 a aktivuje IRAK-1, který aktivuje aktivační protein 1 (AP-1) a snižuje produkci adiponektinu. Vysokotuková dieta indukuje obezitu, snižuje expresi adiponektinu prostřednictvím zvýšené hladiny intracelulární protein kinázy A zprostředkovanou aktivací CREB. Důkazy naznačují, že inzulín pozitivně reguluje expresi genu adiponektinu aktivací PPAR γ prostřednictvím FoxO1 aktivity. Avšak inzulín a adiponektin koreluje negativně. FoxO1 zvyšuje expresi adiponektinu prostřednictvím interakce s C/EBP. Převzato a upraveno podle Shehzad et al. 2012

3.4.6 Leptin

Je 16kDa protein, který je produktem genu obezity (*ob*) (Zhang et al., 1994). Je uvolňován do krevního oběhu, kde se váže na leptin-vazebné proteiny. Ve větší míře je sekretován adipocyty u obézních lidí i zvířat v závislosti na jejich množství a objemu

(Margetic et al., 2002). Jeho produkce je ovlivňována řadou dalších biologicky aktivních látek. Zvýšení uvolňování stimulují například inzulin nebo glukokortikoidy (Margetic et al., 2002). Primární funkcí leptinu je patrně regulace energetické homeostázy a ukládání tuku. Ke snížení hladiny leptinu v krvi dochází během hubnutí. Při poruchách příjmu potravy, jako je anorexie nervosa, může docházet až k patologickému snížení hladiny leptinu související s poruchami fertility (Föcker et al., 2011). Podobně u chlapců a dívek s nedostatkem tukové tkáně dochází k opožděnému nástupu puberty (Weimann et al., 1999).

Leptin je často spojován s kardiovaskulárními poruchami, ať už jde o akutní případy, kdy například po infarktu myokardu dochází ke zvýšení hladiny leptinu (Gundala et al., 2012), nebo u chronických stavů, kdy působí potencionálně aterogenně. Při chronicky zvýšených hladinách může docházet k hypertenzi prostřednictvím aktivace ET systému (Trovati et al., 2014). Na druhou stranu jsou i studie, kde bylo sledováno, že leptin může zvyšovat tvorbu vasorelaxačního oxidu dusnatého (Agata et al., 1997; Aizawa-Abe et al., 2000). Leptin rovněž přispívá k tvorbě trombů (Bodary et al., 2005) a kromě hypertenze stimuluje rozvoj zánětu a oxidačního stresu (Koh et al., 2008). Vysoké hladiny leptinu korelují s rozvojem diabetu 2. typu (Morioka et al., 2014)

VSMC má také receptory pro leptin. Zvýšené hladiny leptinu tak mohou u VSMC ovlivňovat migraci, hypertrofii, proliferaci, produkci ROS nebo expresi metaloproteáz a to prostřednictvím aktivace řady intracelulárních kaskád, jako jsou JAK/STAT, PI3K/Akt, ERK 1/2, p38 MAPK, mTOR a RhoA/ROCK kaskády (Trovati et al., 2014).

Leptin se tedy podílí na rozvoji řady poruch a stále jsou objevovány další poruchy spojené s jeho dysbalancí ať jde o příliš nízké, nebo vysoké hladiny a je tedy stále velmi aktuálním tématem pro výzkum.

4 Cíle diplomové práce

Tuková tkáň je významným producentem parakrině působících biologicky aktivních látek (adipokinů) uplatňujících se i v souvislosti s patogenezí aterosklerózy. Význam perivaskulární tukové tkáně byl v této souvislosti dlouhou dobu přehlížen. Z tohoto důvodu jsme při našich studiích využívali primární linie adipocytů získané izolací z viscerální, subkutánní a epikardiální tukové tkáně a dali si za cíl:

- Přinést nové poznatky o produkci adipokinů v primárních liniích adipocytů v závislosti na původu a míře diferenciaci.
- V *in vitro* kokultivačních studiích sledovat vliv adipokinů obsažených v kondiciovaných médiích získaných inkubací s primárními liniemi adipocytů různého původu a míry diferenciaci na proliferaci buněk hladkého svalstva cév.

5 Metody a materiál

5.1 Buněčné kultury

Jako reprezentativní vzorky pro viscerální tuk byla použita renální tuková tkáň. Vzorky viscerálního a subkutánního tuku, byly odebírány výhradně ze zdravých dárců během tzv. příbuzenské transplantace ledvin. Vzorky epikardiální tukové tkáně (EAT) pocházely od pacientů, kterým bylo srdce explantováno v důsledku kardiomyopatie. Vzorky EAT byly odebírány konkrétně z oblasti pravé části u *a.. coronalis*, *ramus cirkumflex* a anteriorní descendentní větve koronární arterie. Z etických důvodů není možné získávat EAT vzorky ze zdravých jedinců. Do studie byly zařazeny jen vzorky od jedinců bez klinických známek aterosklerózy a diabetu. Všechny vzorky TT pocházejí od mužů středního věku. Body mass index (BMI) dárců vzorku EAT ($N = 2$) bylo $30,6 \pm 0,71 \text{ kg/m}^2$ a BMI dárců vzorků viscerálního a subkutánního tuku ($N = 2$) byl $28,35 \pm 1,2 \text{ kg/m}^2$.

Příprava buněčných kultur z tukové tkáně byla provedena na základě protokolu Frieda a Moustaid-Moussa (Fried and Moustaid-Moussa, 2001). Vzorky EAT byly rozmělněny pomocí nůžek v aseptickém prostředí na malé kousky ($2 - 4 \text{ mm}^3$). Stejně bylo postupováno v případě zpracování viscerálního a subkutánního tuku. Rozmělněné vzorky tukové tkáně byly promyty v PBS, umístěny do roztoku kolagenázy (2 mg/ml kolagenázy, 2% BSA bez mastných kyselin v PBS) a inkubovány v třepačce (200 rpm) při 37°C po dobu 1 hodiny. Následně byly vzorky promyty v PBS a vzniklá buněčná suspenze byla přefiltrována skrze filtry s $200\mu\text{m}$ póry. Flotující tukové buňky (adipocyty) byly odděleny od tzv. stromální vaskulární frakce (SVF) centrifugací (10 min při 200 g). SVF obsahující preadipocyty byla následně několikrát promyta v PBS a nakonec resuspendována v selektivním preadipocytárním růstovém médiu (Promo Cell, Heidelberg, Německo). Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích o objemu 25 cm^3 uložených v inkubátoru při teplotě 37°C a 5 % (v/v) CO_2 . Médium bylo měněno každé 2 až 3 dny.

Při subkonfluentní denzitě byly buňky trypsinizovány a nasazeny v triplicátu do 12-jamkových destiček při počátečním množství $0,1 \times 10^6$ buněk na jamku. Když se buňky namnožily na úroveň zhruba 90% konfluence, byla u nich indukována diferenciací. První 3 dny byly buňky kultivovány v adipocytárním diferenciačním médiu

a následně v adipocytárním výživném médiu (Promo Cell, Heidelberg, Německo). Výsledkem tohoto protokolu o celkové délce 21 dnů bylo získání diferencovaných adipocytů. Úroveň diferenciaci byla určována pomocí oil-red-o barvení (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Tzv. kondiciované médium bylo připraveno následovně: subkonfluentní preadipocyty a adipocyty byly omyty a pěstovány v bezsérovém preadipocytárním růstovém médiu (Promo Cell, Heidelberg, Německo), nebo adipocytárním výživném médiu po dobu 24 hodin. Následovala další 24 hodinová kultivace ve zmíněných médiích následovaná odběrem a centrifugací média (13000 rpm po dobu 10 min při 4°C). Na závěr bylo médium zamraženo a skladováno při -80°C až do dalšího použití. Všechny experimenty byly prováděny na buňkách do úrovně pasáže 6 nebo méně. Každý stav byl analyzován v triplicátu ve dvou nezávislých experimentech.

5.1.1 Oil-red O barvení

Oil red O je v tučích-rozpustné barvivo používané pro histologické vizualizace neutrálních triglyceridů a lipidů. V tomto případě byla assay použita pro určení míry diferenciaci adipogenních kultur primárních preadipocytů na diferencované adipocyty obsahující tukové kapénky.

Diferencované adipocyty byly fixovány v 4% roztoku formaldehydu po dobu 10 minut a následně byly barveny po dobu 30 minut s Oil-red O barvivem rozpuštěném v izopropanolu. Obarvené adipocyty byly následně promyty PBS a pozorovány.

5.2 RT-PCR analýza

Celková RNA byla izolována z každé oddělené jamky kultivační desky zvlášť (n=6 na každý typ adipocytů) za použití RNasy Mini kitu (Qiagen, Venio, Nizozemsko). Detailní postup viz níže. Následně po ošetření DNase I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) byly eliminovány všechny zbytky DNA z izolovaných vzorků RNA. cDNA byla vytvářena na základě pokynů výrobce za použití 400 ng celkové RNA a High Capacity RNA-to-DNA master mixu (detailněji viz níže) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Úrovně genové exprese cytokinů a adipokinů byly měřeny pomocí přístroje Corbett Life Science Rotor Gene 3000 (program viz níže)(Qiagen, Venlo, Nizozemí) za použití QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Venlo, Nizozemí). Nukleotidová sekvence použitých primerů viz Tab. 1, složení mixů viz RT-PCR reakční směs.

Hodnoty B2M byly použity jako endogenní kontroly pro normalizaci. Relativní genové exprese byly spočítány pomocí $\Delta\Delta C_t$ metod, podle postupů práce Pfaffl (Pfaffl, 2001)

Hodnoty B2M byly použity jako endogenní kontroly pro normalizaci. Relativní genové exprese byly spočítány pomocí $\Delta\Delta C_t$ metod, podle postupů práce Pfaffl (Pfaffl, 2001)

Gen	Přední primerová sekvence (5' - 3')	Reverzní primerová sekvence (3' - 5')
IL-6	AGCAGCAAAGAGGCACTGGCA	GCACAGCTCTGGCTTGTTCCTCA
IL-8	TCTGTGTGAAGGTGCAGTTTGTG	TGTGGTCCACTCTCAATCACTC
IL-18	TGACTGTAGAGATAATGCACCCCG	ATCATGTCCTGGGACACTTC
Rantes	AGCAGTCGTCTTTGTACCCC	AAGGAGCGGGTGGGGTAGG
MCP-1	AGAAGCTGTGATCTTCAAGACC	AGCTGCAGATTCTTGGGTTG
Leptin	ACCAGGGAGACCGAGCGCTT	GCATGGCCCTTGCCCTCCTG
Adiponektin	TGGCCTGCCAGCTCTCGTA	AGGCACACAACCTCAGCCAGAGC
B2-mikroglobulin	TCTCTCTTTCTGGCCTGGAG	AATGTCGGATGGATGAAACC

Tab.1: Primery detekovaných látek

- **Izolace RNA za použití RNeasy Mini Kit 50 (cat no: 74104) Qiagen**

1. Ke vzorku konfluentních buněk přidat 350 μ l RTL pufru
Zamíchat vortexováním po dobu 20 sek
2. Ke vzorku přidat 350 μ l 70% chlazeného etanolu. Zamíchat pipetováním a pomocí vortexu po dobu 30 sek
3. Celý objem vzorku napipetovat na kolonku a centrifugovat po dobu 15 sek při 8000.
4. Do kolonky napipetovat 350 μ l RW1 pufru a centrifugovat po dobu 15 sek při 8000 G.

5. Napipetovat 80 μ l DNase I inkubačního mixu (10 μ l DNase I koncentrátu a 70 μ l RDD pufru) přímo na střed kolonky. Kolonku přesunout do nové odpadní tuby. Inkubovat 15 min v pokojové teplotě
 6. Přidat 350 μ l RW1 pufru a centrifugovat po dobu 15 sek při 8000 G.
 7. Přidat 500 μ l RPE pufru s přidaným etanolem. Centrifugovat po dobu 15 sek při 8000 G.
 8. Přidat dalších 500 μ l RPE s etanolem. Centrifugovat 2 min při 8000 G.
 9. Kolonku přendat do nové sběrné mikrozkuhavky a na střed kolonky napipetovat 30 μ l RNase free vody. Inkubovat 1 min při pokojové teplotě a centrifugovat po dobu 1 min při 8000 G.
 10. Změřit koncentraci RNA a RNA skladovat až do dalšího použití při -80°C
- **Štěpení DNázou** (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA):
 1. 400 μ g RNA ředit vodou na celkový objem 10 μ l
 2. k 8 μ l RNA mixu z bodu 1. Přidat 1 μ l 10x buffer a 1 μ l DNase enzymu
 3. inkubovat 15 minut v pokojové teplotě
 4. k mixu přidat 1 μ l STOP roztoku
 5. inkubovat po dobu 10 min při 70°C

- **Reverzní transkripce** (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA):

High Capacity RNA to cDNA Kit (50x 20 µl reakcí)

1. premix na 1x RT-PCR reakci:

reagencie	Rozpis na 1 reakci
Master mix	4 µl
RNA (stěpená DNAsou)	11 µl
DEPC voda	5 µl
celkem	20 µl
reagencie	Rozpis na 1 reakci

Program:

25 °C.....5 min

42 °C30 min

85 °C.....5min

4 stupně.....nekonečno

2. cDNA vyndat z přístroje a skladovat v -80 °C stupních

- **RT-PCR reakční směs (qPCR)**

reagencie	Rozpis na 1 reakci
Power SYBR Green master mix	12,5 µl
Primer mix	1 µl
PCR voda	9,5 µl
cDNA (10x ředěné)	2 µl
celkem	25 µl

- **Program PCR**

Iniciace	95 °C.....10 min
Denaturace	95°C.....15 sec
Hybridizace	XX °C.....30 sec
Elongace	72°C.....30 sec
Melt	74 °C - 95 °C
analýza	Nárůst teploty po 1 °C

XX °C značí teplotu hybridizace, která je optimalizovaná na daný primer

5.3 Proliferační assay

Buňky hladké svaloviny lidské aorty (HAoSMC) (Promo Cell, Heidelberg, Německo) jsme kultivovali s kondicionovanými médii získanými již dříve popsáním způsobem při kultivaci primárních buněčných kultur adipocytů. Média pocházela jak od nediferencovaných, tak i od maturovaných linií primárních adipocytů.

HAoSMC byly nasazeny na pokusné desky v počáteční koncentraci 2×10^3 buněk na jamku. Po uplynutí 72 hodin byly buňky omyty v PBS a inkubovány po dobu 24 hodin v médiu pro HAoSMC bez růstových faktorů (Promo Cell, Heidelberg, Německo). Média z buněčných linií adipocytů a preadipocytů byly přidána v objemu 37,5 % v/v v bezsérovém růstovém médiu pro HAoSMC (Promo Cell, Heidelberg, Německo). Míra proliferace primární kultury HAoSMC během kokultivace s adipocytárními médii byla měřena s využitím i real-time buněčného analyzátoru xCELLigence Systém s E-Plate View 16 (Roche Applied Science, Basel, Švýcarsko). Všechny experimenty byly prováděny na buňkách do úrovně pasáže 6 nebo méně. Každý stav byl analyzován v triplicátu ve dvou nezávislých experimentech.

5.4 Luminex assay

Luminex assay je multiplexní kuličkový imunotest umožňující detekci více analytů (v našem případě adipokinů) ve vzorku najednou pomocí směsi protilátek značených kuliček s barevným kódem, na které se vážou odpovídající působky přítomné ve vzorku.

V naší studii byla Luminexová assay využita pro detekci adipokinů (IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF a adiponektinu) (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN USA) v kondicionovaných médiích získaných po 24 hodinové inkubaci s primárními liniemi adipocytů. Značení bylo prováděno v 96-jamkových destičkách. Při přípravě a provádění testů bylo postupováno striktně dle pokynů doporučených výrobcem (detailní postup viz níže). Každé testované médium, stejně jako vzorky standardu a kontrolní vzorky, bylo testováno v triplicátu ve dvou nezávislých experimentech (celkové množství $n=6$ pro každý stav). Destičky byly měřeny na analyzátoru Luminex 100 (PerkinElmer, Inc, MA, USA) za použití xPONENT softwaru (Luminex, Austin, TX, USA). Hodnoty vzorků byly zprůměrovány a byla odečtena průměrná střední intenzita fluorescence (MFI-Median fluorescence intensity) blanku. Bylo nastaveno akviziční rozhraní mezi

7500 a 15500 pro diskriminaci dvojitych událostí, což zajistilo měření pouze jednotlivých mikrokuliček. Z každé jamky byl tímto způsobem změřen signál ze 100 kuliček a byly získány hodnoty MFI. Hodnoty MFI byly následně s pomocí údajů z kalibrační křivky pro každý z použitých standardů převedeny pomocí Milliplex Analyst softwaru (Millipore) na hodnoty koncentrace (ng/μl).

- **Příprava luminex assay, R&D Systems, Inc.**

1. Navlhčit mikrotitrační desky přidáním 100 μl promývacího pufru (20 ml Wash Buffer Concentrate zředěný destilovanou, nebo neionizovanou vodou na 500 ml). Tekutinu ihned odstraníme odsátím pomocí vakuové odsávačky pro mikrotitrační destičky.
2. Resuspendujeme zředěnou směs mikropartikulí (pro 96-jamkovou destičku zředíme 50 μl Microparticle Concentrate od všech detekovaných látek pomocí 5 ml Microparticle Diluent). Směs je nutno těsně před použitím zvortexovat. Mikropartikule rozpipetujeme po 50 μl do každé jamky.
3. Přidáme 50 μl standardu, blanku nebo vzorku na jamku. Desku zakryjeme a inkubujeme 3 hodiny při pokojové teplotě na horizontální třepačce mikrotitračních destiček při 500 rpm
4. Odsajeme tekutinu. Desku promyjeme promývacím pufrem (100 μl na jamku) a opět odsajeme. Opakujeme 3 krát.
5. Do každé jamky napipetujeme 50 μl zředěného Biotin Antibody Cocktail roztoku (Biotin Antibody Concentrate). Desku inkubujeme 1 hod při pokojové teplotě na horizontální třepačce při 500 rpm.
6. Opakujeme 4. krok.
7. Do každé jamky pipetujeme 50 μl zředěného roztoku Streptavidin-PE (55 μl Streptavidin-PE zředíme pomocí 5,5 ml promývacího pufru). Desku pevně zakryjeme folií a inkubujeme 30 min při pokojové teplotě na třepačce při 500 rpm.
8. Opakujeme 4. krok.
9. Resuspendujeme obsah jamek přidáním 100 μl promývacího pufru na jamku. Inkubujeme 2 min na třepačce při 500 rpm.
10. Do 90 min měříme pomocí Luminex Bio-Rad Analyzer.

5.5 Statistická analýza

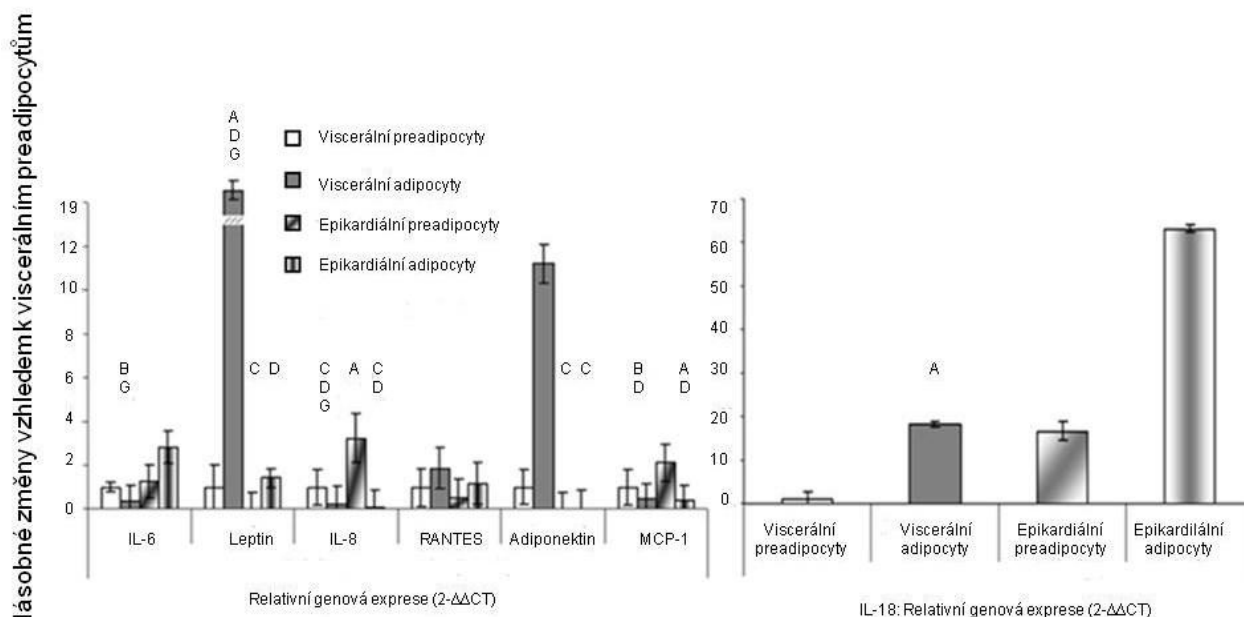
Data jsou vždy prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Statistická analýza byla provedena pomocí Studentova t-testu nebo ANOVA s užitím post hoc Bonferroniho vícenásobného srovnávacího testu. Rozdíly byly považovány za statisticky signifikantní na hladině $p < 0,05$.

6 Výsledky

6.1 Genové exprese v primárních buněčných liniích adipocytů a preadipocytů

Úrovně genové exprese cytokinů (IL-6, IL-8, IL-18, RANTES a MCP-1) a adipokinů (leptinu a adiponektinu) byly měřeny na primárních buněčných liniích nediferencovaných i maturovaných epikardiálních a viscerálních adipocytů za použití qPCR.

Naše data vykazují 3,25-krát zvýšenou expresi IL-8 v epikardiálních preadipocytech ve srovnání s viscerálními preadipocyty ($p < 0,05$) (Obr. 8A a 8B). Ačkoli nesignifikantně, IL-18 také vykazuje zvýšenou expresi v epikardiálních preadipocytech ve srovnání s viscerálními preadipocyty (15,7-krát, $p = 0,064$). Úroveň exprese ateroprotektivního adiponektinu spolu s expresí prozánětlivého leptinu byly signifikantně nižší v kulturách epikardiálních adipocytů ve srovnání s viscerálními preadipocyty ($p < 0,0001$). Navíc naše výsledky vykazují spojitosti mezi mírou diferenciací a původem buněk. Pozorovali jsme změnu na úrovni exprese prozánětlivých genů leptinu (825-krát, $p < 0,05$), IL-8 (0,016-krát, $p < 0,01$) a MCP-1 (0,19-krát, $p < 0,05$) v epikardiálních adipocytech ve srovnání s epikardiálními preadipocyty spolu se zvýšenou mírou exprese IL-6 (8,13-krát, $p < 0,05$) v epikardiálních adipocytech ve srovnání s viscerálními adipocyty. Naopak leptin vykazoval signifikantně vyšší expresi ve viscerálních adipocytech ve srovnání s epikardiálními adipocyty (13,47-krát, $p < 0,05$). Ve srovnání s viscerálními preadipocyty, naše výsledky ukázaly 19,16-násobně zvýšení exprese leptinu ($p < 0,05$) ve viscerálních adipocytech.



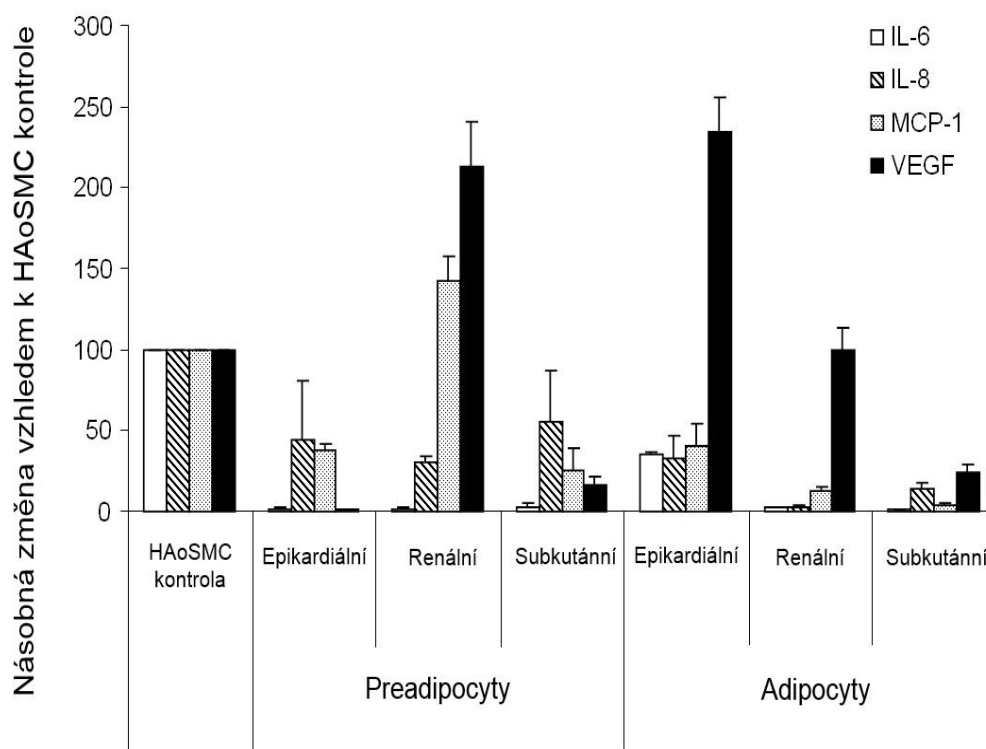
Obr. 8: Relativní genové exprese (A) IL-6, leptinu, IL-8, RANTES, adiponektinu, MCP-1 a (B) IL-18 v lidských preadipocytech a diferencovaných adipocytech. Data byla normalizována k beta2-mikroglobulinu (B2M). Úroveň exprese je relativně vztažena k hladinám viscerálním preadipocytů. Měření byla prováděna v triplicátech a výsledky byly prezentovány jako průměr ± SD pro dvě nezávislá měření. Genová exprese viscerálních preadipocytů byla považována za 100 %, nebo 1,0. Hodnoty byly považovány za signifikantní při $p < 0,05$. A $p < 0,05$, B $p < 0,01$, C $p < 0,001$, vůči viscerálním preadipocytům; D $p < 0,05$ vůči epikardiálním preadipocytům; G $p < 0,05$ vůči epikardiálním adipocytům.

6.2 Produkce adipokinů v médiu z nediferencovaných a maturovaných buněčných linií lidských adipocytů

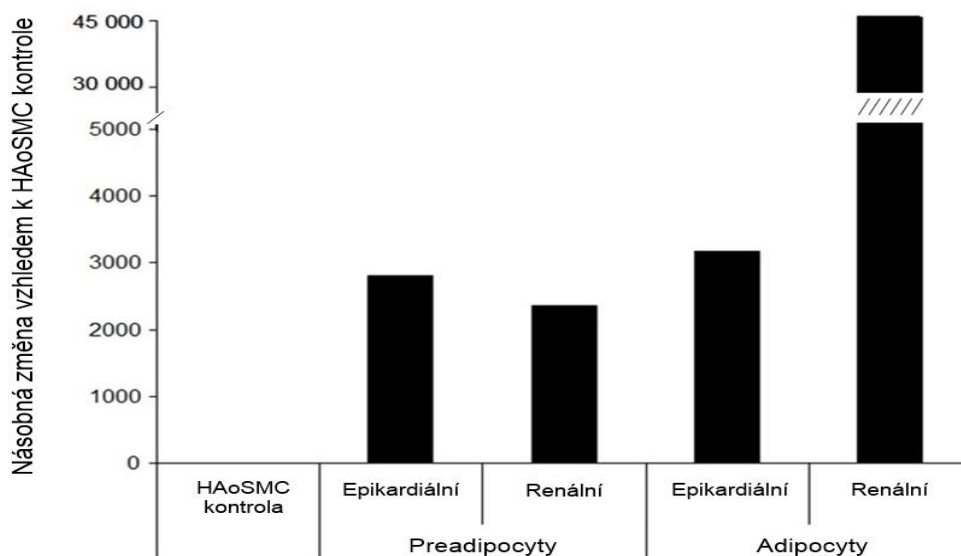
Produkce adipokinů (IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF a adiponektinu) v kondiciovaných médiích získaných kultivací s primárními liniemi epikardiálních, renálních a subkutánních preadipocytů a plně diferencovaných adipocytů byla měřena Luminex testem. Jako referenční standard (100 %) byl použit obsah adipokinů v kondiciovaném médiu primární buněčné linie HAoSMC (Obr. 9A, 9B; statistická signifikance je zmíněna v Tab. 2). Naše výsledky ukazují různé úrovně produkce adipokinů v závislosti na původu buněk a úrovni jejich diferenciaci. V čistém kontrolním preadipocytárním růstovém médiu, adipocytárním výživném médiu nebo růstovém médiu pro buňky hladkého svalstva, tj. v médiích neinkubovaných spolu s buňkami, nebyla prokázána přítomnost IL-6, IL-8, MCP-1 ani VEGF.

Naše výsledky ukazují, že až na výjimky produkovaly HAoSMC v kondiciovaném médiu signifikantně vyšší množství IL-6, IL-8, MCP-1 a VEGF ve srovnání kondiciovanými médii získanými po kultivaci s buněčnými liniemi preadipocytů a adipocytů (pro všechny skupiny, $p < 0,01$). Jen v renálním preadipocytárním médiu byla detekována vyšší produkce MCP-1 ve srovnání s HAoSMC kontrolou ($p < 0,5$). Renální preadipocytární médium a epikardiální adipocytární médium pak vykazovaly vyšší produkci VEGF oproti HAoSMC kontrole ($p < 0,001$). Produkce IL-6 z epikardiálních adipocytů byla vyšší než produkce tohoto cytokinu v kondiciovaných médiích ostatních buněčných linií ($p < 0,001$). Obsah IL-8 v kondiciovaném médiu renálních adipocytů byl pak v porovnání se všemi ostatními kondiciovanými médii nižší (pro všechny skupiny $p < 0,05$). Obdobně jako v případě IL6, i produkce IL-8 se lišila mezi maturovanými adipocyty v závislosti na jejich původu. Produkce VEGF v epikardiálních preadipocytech byla signifikantně redukována oproti ostatním buněčným liniím ($p < 0,01$). V případě média plně diferencovaných epikardiálních adipocytů však byla koncentrace VEGF vůči ostatním kondiciovaným médiím statisticky významně vyšší. Na rozdíl od toho vysoký obsah VEGF v médiu renálních preadipocytů vykazovala výrazný pokles ve srovnání s hodnotami u plně diferencovaných renálních adipocytů ($p < 0,001$). Produkce adiponektinu renálními adipocyty byla vyšší než v případě ostatních buněčných linií ($p < 0,001$).

Lze tedy říci, že námi získané výsledky svědčí o tom, že produkce adipokinů závisí na míře diferenciacie adipocytů a jejich původu.



Obr. 8A



Obr. 8B: Relativní obsah adipokinů (IL6, IL8, MCP1, VEGF a adiponektinu) v kondiciovaných médiích. Kondiciovaná média byla získána po 24 hodinové inkubaci kontrolní linie HAoSMC buněk a linií adipocytů (jak nediferencovaných, tak plně diferencovaných). Obsah adipokinů v médiu primární linie odvozené od HAoSMC byl považován za referenční standard (100 %, nebo 1,0). Obrázek 1A zobrazuje obsah IL6, IL8, MCP1 a VEGF v kondiciovaných médiích. Obrázek 1B zobrazuje obsah adiponektinu v kondiciovaných médiích. Všechny experimenty byly prováděny v triplicátech a výsledky jsou uvedeny jako průměr ± SD ze dvou nezávislých experimentů. Hodnoty statistické významnosti pro obrázky 1A a 1B jsou uvedeny v Tab. 2. Hodnoty byly považovány za signifikantní při $p < 0,05$.

		Epikardiální preadipocyt. médium	Renální preadipocyt. médium	Subkutánní preadipocyt. médium	Epikardiální adipocyt. médium	Renální adipocyt. médium	Subkutánní adipocyt.. médium
Vs. HAoSMC médium	IL-6	*** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓
	IL-8	n.s.	*** ↓	n.s.	** ↓	*** ↓	*** ↓
	MCP-1	*** ↓	* ↑	*** ↓	** ↓	*** ↓	*** ↓
	VEGF	*** ↓	*** ↑	*** ↓	*** ↑	n.s.	*** ↓
	Adiponektin	** ↑	n.s.	n.a.	n.s.	*** ↑	n.a.
Vs. Epikard. adipocyt. médium	IL-6	*** ↓	*** ↓	*** ↓	p=1	*** ↓	*** ↓
	IL-8	n.s.	n.s.	n.s.	p=1	* ↓	n.s.
	MCP-1	n.s.	*** ↑	n.s.	p=1	* ↓	** ↓
	VEGF	*** ↓	n.s.	*** ↓	p=1	*** ↓	*** ↓
	Adiponektin	n.s.	n.s.	n.a.	p=1	** ↑	n.a.
Vs. Renální adipocytární médium	IL-6	n.s.	n.s.	n.s.	*** ↑	p=1	n.s.
	IL-8	n.s.	*** ↑	n.s.	* ↑	p=1	*** ↑
	MCP-1	*** ↑	*** ↑	n.s.	* ↑	p=1	*** ↓
	VEGF	** ↓	*** ↑	n.s.	*** ↑	p=1	n.s.
	Adiponektin	*** ↓	*** ↓	n.a.	** ↓	p=1	n.a.
Vs. Subkutánní adipocyt.médium	IL-6	n.s.	*** ↑	n.s.	*** ↑	n.s.	p=1
	IL-8	n.s.	*** ↑	n.s.	n.s.	*** ↓	p=1
	MCP-1	*** ↑	*** ↑	n.s.	** ↑	*** ↑	p=1
	VEGF	*** ↓	*** ↑	n.s.	*** ↑	n.s.	p=1
	Adiponektin	*** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓

Tab. 2: Hladina významnosti obsahu adipokinů (IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF a adiponektinu) v kondiciovaných médiích získaném po 24 hod. inkubaci s liniemi adipocytů a preadipocytů. * p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05, n.s. – není signifikantní, n.a. – nebyl analyzován**
Hodnoty byly považovány za signifikantní při p<0,05.

6.3 Vliv kokultivace adipocytů a buněk hladké svaloviny aorty na proliferaci

S cílem získat informace o účincích adipokinů na proliferaci buněk hladkého svalstva cév jsme měřili míru proliferace HAoSMC v reálném čase. HAoSMC byly kultivovány spolu s kondiciovanými médii získanými kultivací s liniemi renálních a epikardiálních preadipocytů a adipocytů. Opakované měření ukázalo, že přidání epikardiálního adipocytárního média zvyšuje míru proliferace HAoSMC ve srovnání s kontrolními HAoSMC bez přidání kondiciovaných médií ($p < 0,05$). Nenašli jsme žádné stimulační účinky na proliferaci HAoSMC po přidání kondiciovaných médií renálních a epikardiálních preadipocytů. Ani v případě kondiciovaného média renálních adipocytů se nepodařilo prokázat jeho proliferační vliv.

7 Diskuze

Obezita je asociována se zvýšeným rizikem rozvoje aterosklerózy a jejich klinických komplikací. Jsou to právě adipokiny, které mohou po molekulární stránce spojit vliv obezity na patogenezi aterosklerózy (Calle et al., 1999; Mathieu et al., 2010). Perivaskulární tuková tkáň je významným endokrinním a parakrinním orgánem produkujícím řadu biologicky aktivních látek (Mazurek et al., 2003; Miao and Li, 2012; Yudkin et al., 2005). Vzhledem k absenci anatomické bariery účinné látky vylučované adipocyty snadno pronikají do cévní stěny (Barandier et al., 2005; Rajsheker et al., 2010). Abnormální proliferace VSMC hraje důležitou roli v patogenezi aterosklerózy a restenózy. Adipocyty produkují řadu parakrinně působících adipokinů schopných ovlivnit proliferaci a migraci VSMC (Szasz et al., 2013). Lokální sekrece adipokinů perivaskulární tukovou tkání tak prostřednictvím těchto mechanismů může přímo spojit obezitu s rozvojem proliferativních cévních onemocnění (Iacobellis et al., 2008, 2003).

Výsledky našich studií prokázaly, že za bazálních podmínek, tj. při absenci aterosklerózy a diabetu, nejsou zdrojem prozánětlivých médiátorů pouze imunitní buňky infiltrující tukovou tkáň. Samotné adipocyty jsou významným zdrojem těchto biologicky aktivních látek. Při studiu genových expresí jsme prokázali zvýšenou expresi prozánětlivých cytokinů majících relevantní souvislost s patogenezi aterosklerózy (IL6, IL8, IL18 a MCP1) v liniích epikardiálních adipocytů v závislosti na míře diferenciaci a současnou sníženou expresi adiponektinu. Následná měření obsahu adipokinů produkovaných do kondiciovaných médií ukázala na trendy, které byly až na výjimky ve shodě s mírou genové exprese adipokinů. Naše výsledky naznačují, že se epikardiální adipocyty od viscerálních (renálních) adipocytů podstatně liší a že vykazují prozánětlivý fenotyp i při bazálních podmínkách. Výsledky kokultivačních studií pak prokázaly stimulační vliv kondiciovaných médií diferenciovaných epikardiálních adipocytů na proliferaci HaoSMC.

Na základě našich poznatků, výzkum srovnávající genové exprese lidských epikardiálních preadipocytů a *in vitro* diferenciovaných adipocytů za bazálních podmínek nebyly zatím provedeny. Podobný výzkum byl prováděn Fain a kolektivem (2008). Výsledky těchto studií prokázaly, že prozánětlivé cytokiny jako MCP-1, IL-6, IL 8,

PAI-1 a IL-1 β , jsou převážně exprimovány v omentálních preadipocytech. EAT a omentální tuk mají stejný embryonální původ (Ho and Shimada, 1978). Nicméně výsledky této studie jsou pravděpodobně ovlivněny extrémní obezitou dárců. Obezita je téměř vždy spojena se zánětem v TT. V souvislosti se zánětlivými procesy v tukové tkáni, je často zmiňována masivní infiltrace zánětlivými buňkami. Tyto buňky jsou považovány za významný zdroj různých cytokinů a mediátorů, které mohou významně přispívat k rozvoji prozánětlivého prostředí a ke konečné progresi aterosklerózy (Baker et al., 2006; Mazurek et al., 2003). Naše výsledky naznačují, že za bazálních podmínek nejen infiltrující buňky, ale samy epikardiální adipocyty jsou producenty prozánětlivých cytokinů majících relevantní vztah k patofyziologii aterosklerózy. Výsledky našich měření by mohly být případně ovlivněny genovou expresí makrofágů. Nicméně studie Mangan a Wahl ukázala, že životnost nestimulovaných MF izolovaných spolu s preadipocyty jsou v buněčné kultuře životaschopné maximálně 5-6 dnů (Mangan and Wahl, 1991). V našich experimentech však byly buňky kultivovány minimálně 8 dnů, než byly použity pro izolaci RNA.

Jak prokázaly naše další studie s kondiciovanými médii, genová exprese a následná reálná produkce a uvolňování látek do okolí se může lišit, jako v případě IL-6 a MCP-1. Exprese těchto adipokinů epikardiálními preadipocyty byla ve srovnání s expresí v ostatních primárních liniích vyšší, avšak jejich obsah v kondiciovaných médiích byl relativně malý. Tyto rozdíly mohou souviset s regulací translace, mechanismy uvolňování působků z buněk nebo s jejich stabilitou v kondiciovaných médiích.

Kromě toho jsme popsali zvýšenou úroveň proliferace HAOsMC během kokultivace s médiem epikardiálních adipocytů. VSMC představuje spolu s buňkami endotelu jeden z nejrozšířenějších buněčných typů nacházejících se v cévní stěně. Abnormální proliferace a migrace VSMC má velký význam pro rozvoj aterosklerózy. Bioaktivní látky uvolňované adipocyty mohou vést k dysfunkci buněk hladké svaloviny a přispívat tak k rozvoji proliferativních cévních onemocnění.

Výsledky naší studie odpovídají výsledkům dřívější studie Lamerse a kolektivu (2011), kteří prokázali pozitivní vliv kondiciovaných médií získaných inkubací s primárními kulturami lidských adipocytů, na proliferaci VSMC koronárních arterií. Tato práce také postulovala, že tento proliferaci stimulující efekt negativně

koreluje s koncentrací adiponektinu v médiu. Autoři však nenašli žádnou korelaci týkající se IL-6. V dalších studiích provedených stejnou skupinou byla nalezena silná korelace mezi koncentrací VEGF v médiu a mírou proliferace VSMC. VEGF tedy, jak se zdá, přispívá k proliferaci VSMC prostřednictvím parakrinního, nebo autokrinního mechanismu působení. Ošetření buněk VSMC pomocí média obsahujícího VEGF stimulovalo sekreci VEGF z VSMC a vedlo ke zvýšené expresi VEGF receptoru 1 a 2 v závislosti na dávce VEGF (Schlich et al., 2013).

Přestože naše data částečně souhlasí s poznatky práce Schlich a kolektivu (2013), nebyli jsme schopni potvrdit klíčovou roli VEGF jako prostředníka parakrinního působení adipocytů na buňky hladkého svalstva. Naše data ukazují, že pouze kondiciované médium od maturovaných epikardiálních adipocytů bylo schopné stimulovat proliferaci HAoSMC. Média od epikardiálních a renálních preadipocytů a renálních adipocytů neměla žádný vliv na růst HAoSMC ve srovnání s kontrolami. Přestože byl obsah VEGF zvýšený v médiích jak epikardiálních adipocytů, tak renálních, preadipocytů, renální preadipocytární médium vykazovalo oproti epikardiálnímu pouze mírný stimulační efekt na proliferaci HAoSMC.

Můžeme spekulovat o několika vysvětlení tohoto jevu. Zaprvé: v naší studii byla použita média získaná z primárních buněčných linií adipocytů, které byly získány výhradně z tukové tkáně dárců bez známek diabetu a aterosklerózy. Práce Schlich a kolektivu (2013) srovnávala obsah VEGF a vliv na proliferaci VSMC ve vzorcích tukové tkáně i od obézních dárců a dárců s diabetem. Jejich výsledky ukázaly nízkou produkci VEGF z viscerálního a podkožního tuku od štíhlých dárců. A také, že tyto vzorky od štíhlých dárců nemají žádný efekt na míru proliferace VSMC. V případě viscerálního tukové tkáně přítomnost obezity, zejména v kombinaci s diabetem, jak se zdá, výrazně zvyšuje hladiny VEGF, spolu s rychlostí proliferace VSMC. Můžeme jediné spekulovat o účinku kondiciovaného média epikardiální tukové tkáně od štíhlých dárců bez diabetu na proliferaci VSMC. Je třeba poznamenat, že ve studii Schlich a kolektivu byla použita komplexní kondiciovaná média získaná inkubací s tukovou tkání pocházející z biopsií, kdežto v naší studii byla použita kondiciovaná média získaná inkubací s primárními buněčnými liniemi.

Zadruhé: rozdíl mezi výsledky míry proliferace HAoSMC může být, alespoň částečně, způsoben hladinou adiponektinu v médiu získaném inkubací s renálními adipocyty.

Obsah adiponektinu v tomto konkrétním médiu byl vyšší ve srovnání se všemi ostatními kondiciovanými médii. Studie Lamerse a kolektivu (2011) ukázala, že obsah adiponektinu negativně koreluje s proliferací buněk VSMC (Lamers et al., 2011).

Zatřetí: vzhledem k tomu, že sekreční profil lidských adipocytů je velmi komplexní, je pravděpodobné, že interakce mnoha adipokinů může ovlivnit konečný výsledek. Nedávná studie Ruana a kolektivu (2010) se zabývala analýzou sekretomu perivaskulárních adipocytů pomocí kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Jejich proteomické analýzy identifikovaly 81 proteinů dekretovaných v PVAT, včetně 21 proteinů již dříve známých a 60 proteinů, které byly detekovány úplně poprvé. Účinky jednotlivých složek produkovaných adipocyty na proliferaci VSMC by bylo možno studovat prostřednictvím použití specifických inhibitorů.

Předkládaná magisterská práce má několik metodických omezení. Z etických a technických důvodů nebylo možno odebírat vzorky EAT a vzorky podkožního a viscerálního tuku od jednoho dárce. Toto omezení jsme se snažili eliminovat výběrem vhodných vzorků získaných od pacientů stejného pohlaví, podobného BMI a věku v konkrétních skupinách. Další omezení představuje samotný odběr vzorků EAT, který samozřejmě nebylo možno provést od zcela zdravých dárců. Není možno vyloučit možnost, že probíhající patologie (kardiomyopatie) neovlivnila zánětlivý stav. Předchozí studie (Hug and Lodish, 2005; Mazurek et al., 2003; Sacks and Fain, 2007) prokázaly, že nejvýznamnějším zdrojem zánětu v perivaskulární tkáni je přítomnost koronární arteriální choroby. Z tohoto důvodu byly ve studii použity jen vzorky od pacientů, u kterých nebyly standardními laboratorními testy nalezeny žádné známky aterosklerózy. Pacienti neměli rovněž žádnou dlouhodobou medikaci, která by, podle našich znalostí, mohla ovlivnit výsledky studie.

8 Závěr

Cílem práce bylo porovnat produkci adipokinů v primárních liniích adipocytů v závislosti na původu a stupni diferenciaci a v *in vitro* kokultivačních studiích sledovat vliv adipokinů obsažených v kondicionaných médiích na míru proliferace HAoSMC. Měření genové exprese prozánětlivých adipokinů a adiponektinu a produkce adipokinů do kondicionovaných médiích získaných po 24hodinové inkubaci s buňkami primárních linií prokázalo odlišnou produkci adipokinů v epikardiálních a viscerálních adipocytech ovlivněnou i mírou diferenciaci. Výsledky kokultivačních studií pak naznačily potenciálně stimulující vliv biologicky aktivních látek produkovaných epikardiálními adipocyty na proliferaci HAoSMC.

Výsledky naší studie tak prokazují, že epikardiální adipocyty se od viscerálních liší jak produkcí adipokinů, tak mírou vlivu na HAoSMC. Tento mechanismus může lokálně přispívat k rozvoji proliferativních onemocnění cév.

9 Literatura

- Abeywardena, M.Y., Leifert, W.R., Warnes, K.E., Varghese, J.N., Head, R.J., 2009.** Cardiovascular biology of interleukin-6. *Curr Pharm Des* 15, 1809–21.
- Agata, J., Masuda, A., Takada, M., Higashiura, K., Murakami, H., Miyazaki, Y., Shimamoto, K., 1997.** High plasma immunoreactive leptin level in essential hypertension. *Am J Hypertens* 10, 1171–1174.
- Ahmad, W.M.A.W., Aleng, N.A., Halim, N.A., 2013.** Male and Female Differences in the High Density Lipoprotein (HDL) and Progression of Diabetic Disease in Coronary Heart Disease Patients. *Appl Math Sci* 7, 1835–1838.
- Aizawa-Abe, M., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Ebihara, K., Satoh, N., Iwai, H., Matsuoka, N., Hayashi, T., Hosoda, K., Inoue, G., Yoshimasa, Y., Nakao, K., 2000.** Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest* 105, 1243–1252.
- Ammarguella, F.Z., Gannon, P.O., Amiri, F., Schiffrin, E.L., 2002.** Fibrosis, Matrix Metalloproteinases, and Inflammation in the Heart of DOCA-Salt Hypertensive Rats: Role of ETA Receptors. *Hypertension* 39, 679–684.
- Bäck, M., 2009.** Leukotriene signaling in atherosclerosis and ischemia. *Cardiovasc Drugs Ther* 23, 41–48.
- Badimon, L., Vilahur, G., 2012.** LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann N Y Acad Sci* 1254, 18–32.
- Bahia, L., Aguiar, L.G., Villela, N., Bottino, D., Godoy-Matos, A.F., Geloneze, B., Tambascia, M., Bouskela, E., 2006.** Relationship between adipokines, inflammation, and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome. *Clinics (Sao Paulo)* 61, 433–440.
- Baker, A.R., Silva, N.F. da, Quinn, D.W., Harte, A.L., Pagano, D., Bonser, R.S., Kumar, S., McTernan, P.G., 2006.** Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 5, 1.
- Barandier, C., Montani, J.-P., Yang, Z., 2005.** Mature adipocytes and perivascular adipose tissue stimulate vascular smooth muscle cell proliferation: effects of aging and obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H1807–H1813.
- Bergman, R.N., Kim, S.P., Hsu, I.R., Catalano, K.J., Chiu, J.D., Kabir, M., Richey, J.M., Ader, M., 2007.** Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *Am J Med* 120, S3–8; discussion S29–32.

- Bodary, P.F., Gu, S., Shen, Y., Hasty, A.H., Buckler, J.M., Eitzman, D.T., 2005.** Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, e119–e122.
- Booth, G., Stalker, T.J., Lefer, A.M., Scalia, R., 2002.** Mechanisms of Amelioration of Glucose-Induced Endothelial Dysfunction Following Inhibition of Protein Kinase C In Vivo. *Diabetes* 51, 1556–1564.
- Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., Charo, I.F., 1998.** Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894–7.
- Brasier, A.R., Jamaluddin, M., Han, Y., Patterson, C., Runge, M.S., 2000.** Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 212, 155–169.
- Brownlee, M., 2000.** Negative consequences of glycation. *Metabolism* 49, 9–13.
- Brownlee, M., 2001.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–20.
- Bruun, J.M., Lihn, A.S., Madan, A.K., Pedersen, S.B., Schiøtt, K.M., Fain, J.N., Richelsen, B., 2004.** Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E8–E13.
- Bruun, J.M., Lihn, A.S., Pedersen, S.B., Richelsen, B., 2005.** Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2282–2289.
- Burger, P.C., Wagner, D.D., 2003.** Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* 101, 2661–2666.
- Calle, E.E., Thun, M.J., Petrelli, J.M., Rodriguez, C., Heath, C.W., 1999.** Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 341, 1097–1105.
- Castoldi, G., Di Gioia, C.R.T., Pieruzzi, F., D'Orlando, C., Van De Greef, W.M.M., Busca, G., Sperti, G., Stella, A., 2003.** ANG II increases TIMP-1 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H635–43.
- Celletti, F.L., Waugh, J.M., Amabile, P.G., Brendolan, A., Hilfiker, P.R., Dake, M.D., 2001.** Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 7, 425–429.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., Obin, M.S., 2005.** Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46, 2347–55.

- Corradi, D., Maestri, R., Callegari, S., Pastori, P., Goldoni, M., Luong, T.V., Bordi, C.,** 2004. The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts. *Cardiovasc Pathol* 13, 313–316.
- Csiszar, A., Sosnowska, D., Wang, M., Lakatta, E.G., Sonntag, W.E., Ungvari, Z.,** 2012. Age-associated proinflammatory secretory phenotype in vascular smooth muscle cells from the non-human primate *Macaca mulatta*: reversal by resveratrol treatment. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67, 811–20.
- Curat, C.A., Wegner, V., Sengenès, C., Miranville, A., Tonus, C., Busse, R., Bouloumié, A.,** 2006. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 49, 744–7.
- Davis-Dusenbery, B.N., Wu, C., Hata, a,** 2011. Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arter Thromb Vasc Biol* 31, 2370–2377.
- DeFronzo, R.A.,** 2010. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: The missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 53, 1270–1287.
- Després, J.-P., Lemieux, I., Bergeron, J., Pibarot, P., Mathieu, P., Larose, E., Rodés-Cabau, J., Bertrand, O.F., Poirier, P.,** 2008. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1039–1049.
- Deveaud, C., Beauvoit, B., Salin, B., Schaeffer, J., Rigoulet, M.,** 2004. Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes. *Mol Cell Biochem* 267, 157–166.
- Dhaun, N., Goddard, J., Kohan, D.E., Pollock, D.M., Schiffrin, E.L., Webb, D.J.,** 2008. Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on. *Hypertension* 52, 452–9.
- Dovizio, M., Alberti, S., Guillem-Llobat, P., Patrignani, P.,** 2014. Role of platelets in inflammation and cancer: novel therapeutic strategies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 114, 118–27.
- Drong, A.W., Lindgren, C.M., McCarthy, M.I.,** 2012. The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. *Clin Pharmacol Ther* 92, 707–15.
- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., Bahouth, S.W.,** 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273–2282.
- Fantuzzi, G.,** 2005. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*.

- Felx, M., Guyot, M.-C., Isler, M., Turcotte, R.E., Doyon, J., Khatib, A.-M., Leclerc, S., Moreau, A., Moldovan, F.,** 2006. Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF-kappaB in human osteosarcoma. *Clin Sci (Lond)* 110, 645–54.
- Föcker, M., Timmesfeld, N., Scherag, S., Bühren, K., Langkamp, M., Dempfle, A., Sheridan, E.M., de Zwaan, M., Fleischhaker, C., Herzog, W., Egberts, K., Zipfel, S., Herpertz-Dahlmann, B., Hebebrand, J.,** 2011. Screening for anorexia nervosa via measurement of serum leptin levels. *J Neural Transm* 118, 571–578.
- Frayn, K.N.,** 2000. Visceral fat and insulin resistance--causative or correlative? *Br J Nutr* 83 Suppl 1, S71–S77.
- Fried, S.K., Moustaid-Moussa, N.,** 2001. Culture of adipose tissue and isolated adipocytes. *Methods Mol Biol* 155, 197–212.
- Furuhashi, M., Ura, N., Higashiura, K., Murakami, H., Tanaka, M., Moniwa, N., Yoshida, D., Shimamoto, K.,** 2003. Blockade of the renin-angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension. *Hypertension* 42, 76–81.
- Galis, Z.S., Khatiri, J.J.,** 2002. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90, 251–262.
- Gao, Y.J., Takemori, K., Su, L.Y., An, W.S., Lu, C., Sharma, A.M., Lee, R.M.K.W.,** 2006. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc Res* 71, 363–373.
- Goldstein, B.J., Scalia, R.,** 2004. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2563–2568.
- Gomez, A.P., Moreno, M.J., Iglesias, A., Coral, P.X., Hernandez, A.,** 2007. Endothelin 1, its Endothelin Type A Receptor, Connective Tissue Growth Factor, Platelet-Derived Growth Factor, and Adrenomedullin Expression in Lungs of Pulmonary Hypertensive and Nonhypertensive Chickens. *Poult Sci* 86, 909–916.
- Gomez Sandoval, Y.-H., Emehdi Atef, M., Levesque, L.-O., Li, Y., B. Anand-Srivastava, M.,** 2014. Endothelin-1 Signaling in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Curr Vasc Pharmacol* 12, 202–214.
- Greenberg, D.A., Jin, K.,** 2013. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. *Cell Mol Life Sci* 70, 1753–61.
- Grosskreutz, C.L., Anand-Apte, B., Dupláa, C., Quinn, T.P., Terman, B.I., Zetter, B., D'Amore, P.A.,** 1999. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res* 58, 128–36.

- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., Rollins, B.J., 1998.** Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2, 275–281.
- Gundala, R., VK, C., K, R., 2012.** Association of Leptin in Periodontitis and Acute Myocardial Infarction. *J Periodontol* 1–10.
- Guo, L., Wang, M., Zhang, Z.Y., Hao, L., Lou, B.Y., Li, X.Y., Loo, W.T.Y., Jin, L., Cheung, M.N.B., 2011.** Angiotensin II induces interleukin-6 synthesis in osteoblasts through ERK1/2 pathway via AT1 receptor. *Arch Oral Biol* 56, 205–211.
- Hajer, G.R., Van Haeften, T.W., Visseren, F.L.J., 2008.** Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*.
- Hansson, G.K., Libby, P., 2006.** The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6, 508–19.
- Hayek, T., Attias, J., Coleman, R., Brodsky, S., Smith, J., Breslow, J.L., Keidar, S., 1999.** The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovasc Res* 44, 579–587.
- Hayek, T., Attias, J., Smith, J., Breslow, J.L., Keidar, S., 1998.** Antiatherosclerotic and antioxidative effects of captopril in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 31, 540–544.
- Heilbronn, L., Smith, S.R., Ravussin, E., 2004.** Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 4, S12–S21.
- Ho, E., Shimada, Y., 1978.** Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol* 66, 579–85.
- Hodis, H.N., Mack, W.J., Azen, S.P., Lobo, R.A., Shoupe, D., Mahrer, P.R., Faxon, D.P., Cashin-Hemphill, L., Sanmarco, M.E., French, W.J., Shook, T.L., Gaarder, T.D., Mehra, A.O., Rabbani, R., Sevanian, A., Shil, A.B., Torres, M., Vogelbach, K.H., Selzer, R.H., 2003.** Hormone therapy and the progression of coronary-artery atherosclerosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 349, 535–545.
- Hodis, H.N., Mack, W.J., Lobo, R.A., Shoupe, D., Sevanian, A., Mahrer, P.R., Selzer, R.H., Liu Cr, C.R., Liu Ch, C.H., Azen, S.P., 2001.** Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 135, 939–953.
- Hug, C., Lodish, H.F., 2005.** The role of the adipocyte hormone adiponectin in cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 5, 129–134.

- Charpiot, P., Rolland, P.H., Friggi, A., Piquet, P., Scalbert, E., Bodard, H., Barlatier, A., Latrille, V., Tranier, P., Mercier, C., Luccioni, R., Calaf, R., Garcon, D., 1993.** Ace-Inhibition with Perindopril and Atherogenesis-Induced Structural and Functional-Changes in Minipig Arteries. *Arterioscler Thromb* 13, 1125–1138.
- Chatterjee, T.K., Stoll, L.L., Denning, G.M., Harrelson, A., Blomkalns, A.L., Idelman, G., Rothenberg, F.G., Neltner, B., Romig-Martin, S.A., Dickson, E.W., Rudich, S., Weintraub, N.L., 2009.** Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res* 104, 541–549.
- Chhabra, N., 2009.** Endothelial dysfunction – A predictor of atherosclerosis. *Internet J Med Updat* 4, 33–41.
- Chobanian, A. V., Haudenschild, C.C., Nickerson, C., Drago, R., 1990.** Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 15, 327–331.
- Iacobellis, G., Corradi, D., Sharma, A.M., 2005.** Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2, 536–543.
- Iacobellis, G., Gao, Y.-J., Sharma, A.M., 2008.** Do cardiac and perivascular adipose tissue play a role in atherosclerosis? *Curr Diab Rep* 8, 20–24.
- Iacobellis, G., Ribaudo, M.C., Assael, F., Vecchi, E., Tiberti, C., Zappaterreno, A., Di Mario, U., Leonetti, F., 2003.** Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5163–5168.
- Iacobellis, G., Ribaudo, M.C., Zappaterreno, A., Iannucci, C.V., Leonetti, F., 2004.** Relation between epicardial adipose tissue and left ventricular mass. *Am J Cardiol* 94, 1084–1087.
- Ibrahim, M.M., 2010.** Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 11, 11–18.
- Jones, A., Geczy, C.L., 1990.** Thrombin and factor Xa enhance the production of interleukin-1. *Immunology* 71, 236–241.
- Kanter, J.E., Johansson, F., LeBoeuf, R.C., Bornfeldt, K.E., 2007.** Do glucose and lipids exert independent effects on atherosclerotic lesion initiation or progression to advanced plaques? *Circ Res* 100, 769–81.
- Kershaw, E.E., Flier, J.S., 2004.** Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548–56.
- Kim, H.Y., Kang, Y.J., Song, I.H., Choi, H.C., Kim, H.S., 2008.** Upregulation of interleukin-8/CXCL8 in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 31, 515–23.

- Kim, S.H., Han, S.Y., Azam, T., Yoon, D.Y., Dinarello, C.A., 2005.** Interleukin-32: A cytokine and inducer of TNF α . *Immunity* 22, 131–142.
- Kisucka, J., Chauhan, A.K., Zhao, B.-Q., Patten, I.S., Yesilaltay, A., Krieger, M., Wagner, D.D., 2009.** Elevated levels of soluble P-selectin in mice alter blood-brain barrier function, exacerbate stroke, and promote atherosclerosis. *Blood* 113, 6015–6022.
- Kobashi, C., Urakaze, M., Kishida, M., Kibayashi, E., Kobayashi, H., Kihara, S., Funahashi, T., Takata, M., Temaru, R., Sato, A., Yamazaki, K., Nakamura, N., Kobayashi, M., 2005.** Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8. *Circ Res* 97, 1245–1252.
- Koh, K.K., Park, S.M., Quon, M.J., 2008.** Leptin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions. *Circulation* 117, 3238–49.
- Kohno, T., Urao, N., Ashino, T., Sudhakar, V., Inomata, H., Yamaoka-Tojo, M., McKinney, R.D., Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2013.** IQGAP1 links PDGF receptor- β signal to focal adhesions involved in vascular smooth muscle cell migration: role in neointimal formation after vascular injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 305, C591–600.
- Kroll, J., Waltenberger, J., 1999.** A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 265, 636–9.
- Kusano, K., Miyaura, C., Inada, M., Tamura, T., Ito, A., Nagase, H., Kamoi, K., Suda, T., 1998.** Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 139, 1338–45.
- Lam, M.K., Al-Ansari, S., van Dam, G.M., Tio, R.A., Breek, J.-C., Slart, R.H.J.A., Hillebrands, J.-L., Zeebregts, C.J., 2013.** Single-chain VEGF/Cy5.5 targeting vegf receptors to indicate atherosclerotic plaque instability. *Mol Imaging Biol* 15, 250–61.
- Lamers, D., Schlich, R., Greulich, S., Sasson, S., Sell, H., Eckel, J., 2011.** Oleic acid and adipokines synergize in inducing proliferation and inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med* 15, 1177–1188.
- Le, N.-T., Heo, K.-S., Takei, Y., Lee, H., Woo, C.-H., Chang, E., McClain, C., Hurley, C., Wang, X., Li, F., Xu, H., Morrell, C., Sullivan, M.A., Cohen, M.S., Serafimova, I.M., Taunton, J., Fujiwara, K., Abe, J.-I., 2013.** A crucial role for p90RSK-mediated reduction of ERK5 transcriptional activity in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circulation* 127, 486–99.
- Lee, E., Grodzinsky, A.J., Libby, P., Clinton, S.K., Lark, M.W., Lee, R.T., 1995.** Human vascular smooth muscle cell-monocyte interactions and metalloproteinase secretion in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 2284–9.

- Lee, W.L., Liles, W.C.,** 2011. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr Opin Hematol* 18, 191–196.
- Lei, H., Venkatakrishnan, A., Yu, S., Kazlauskas, A.,** 2007. Protein kinase A-dependent translocation of Hsp90 α impairs endothelial nitric-oxide synthase activity in high glucose and diabetes. *J Biol Chem* 282, 9364–71.
- Lerman, A., Edwards, B.S., Hallett, J.W., Heublein, D.M., Sandberg, S.M., Burnett Jr, J.C.,** 1991. Circulation and Tissue Endothelin Immunoreactivity in Advanced Atherosclerosis. *N Engl J Med* 325, 997–1001.
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D. V, Ferrara, N.,** 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306–1309.
- Lewis, C.D., Olson, N.E., Raines, E.W., Reidy, M.A., Jackson, C.L.,** 2001. Modulation of smooth muscle proliferation in rat carotid artery by platelet-derived mediators and fibroblast growth factor-2. *Platelets* 12, 352–358.
- Li, D., Mehta, J.L.,** 2000. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 101, 2889–2895.
- Li, X., Tong, G., Zhang, Y., Liu, S., Jin, Q., Chen, H., Chen, P.,** 2010. Neferine inhibits angiotensin II-stimulated proliferation in vascular smooth muscle cells through heme oxygenase-1. *Acta Pharmacol Sin* 31, 679–86.
- Louis, S.F., Zahradka, P.,** 2010. Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Exp Clin Cardiol* 15, 75–85.
- Luft, V.C., Schmidt, M.I., Pankow, J.S., Couper, D., Ballantyne, C.M., Young, J.H., Duncan, B.B.,** 2013. Chronic inflammation role in the obesity-diabetes association: a case-cohort study. *Diabetol Metab Syndr* 5, 31.
- Ma, J., Wang, Q., Fei, T., Han, J.-D.J., Chen, Y.-G.,** 2007. MCP-1 mediates TGF- β -induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* 109, 987–94.
- Madamanchi, N.R., Vendrov, A., Runge, M.S.,** 2005. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 29–38.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Matsubara, K.,** 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221, 286–289.
- Mäkinen, J., Järvisalo, M.J., Pöllänen, P., Perheentupa, A., Irjala, K., Koskenvuo, M., Mäkinen, J., Huhtaniemi, I., Raitakari, O.T.,** 2005. Increased carotid atherosclerosis in andropausal middle-aged men. *J Am Coll Cardiol* 45, 1603–1608.

- Manco, M., Fernandez-Real, J.M., Equitani, F., Vendrell, J., Valera Mora, M.E., Nanni, G., Tondolo, V., Calvani, M., Ricart, W., Castagneto, M., Mingrone, G., 2007.** Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 483–490.
- Mangan, D.F., Wahl, S.M., 1991.** Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol* 147, 3408–3412.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G., Hill, R.A., 2002.** Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 1407–1433.
- Mathieu, P., Lemieux, I., Després, J.-P., 2010.** Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin Pharmacol Ther* 87, 407–416.
- Matsuzawa, Y., 2005.** Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atheroscler Suppl* 6, 7–14.
- Matsuzawa, Y., Funahashi, T., Kihara, S., Shimomura, I., 2004.** Adiponectin and Metabolic Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 29–33.
- Mazurek, T., Zhang, L., Zalewski, A., Mannion, J.D., Diehl, J.T., Arafat, H., Sarov-Blat, L., O'Brien, S., Keiper, E.A., Johnson, A.G., Martin, J., Goldstein, B.J., Shi, Y., 2003.** Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 108, 2460–2466.
- McCrohon, J.A., Jessup, W., Handelsman, D.J., Celermajer, D.S., 1999.** Androgen exposure increases human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial cell expression of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation* 99, 2317–2322.
- Miao, C.-Y., Li, Z.-Y., 2012.** The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol* 165, 643–58.
- Mohamed-Ali, V., Pinkney, J.H., Coppack, S.W., 1998.** Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22, 1145–1158.
- Molero, L., Farré, J., García-Mendez, A., Jiménez Mateos-Caceres, P., Carrasco Martín, C., Millás, I., Navarro, F., Córdoba, M., Casado, S., López-Farré, A., 2003.** Endothelin-1 induced proinflammatory markers in the myocardium and leukocytes of guinea-pigs: Role of glycoprotein IIB/IIIA receptors. *Cardiovasc Res* 57, 109–118.
- Morioka, T., Emoto, M., Yamazaki, Y., Kawano, N., Imamura, S., Numaguchi, R., Urata, H., Motoyama, K., Mori, K., Fukumoto, S., Koyama, H., Shoji, T., Inaba, M., 2014.** Leptin is associated with vascular endothelial function in overweight patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 13, 10.

- Muller, M., van den Beld, A.W., Bots, M.L., Grobbee, D.E., Lamberts, S.W.J., van der Schouw, Y.T.,** 2004. Endogenous sex hormones and progression of carotid atherosclerosis in elderly men. *Circulation* 109, 2074–2079.
- Myers, P.R., Tanner, M.A.,** 1998. Vascular Endothelial Cell Regulation of Extracellular Matrix Collagen : Role of Nitric Oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 717–722.
- N'Guessan, P.D., Riediger, F., Vardarova, K., Scharf, S., Eitel, J., Opitz, B., Slevogt, H., Weichert, W., Hocke, A.C., Schmeck, B., Suttorp, N., Hippenstiel, S.,** 2009. Statins control oxidized ldl-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 380–386.
- Napoli, C., de Nigris, F., Williams-Ignarro, S., Pignalosa, O., Sica, V., Ignarro, L.J.,** 2006. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide* 15, 265–79.
- Napoli, C., Paolo, D.F., Mancini, F.P., Postiglione, A., Witztum, J.L., Palumbo, G., Wulf, P. and,** 1997. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 100, 2680–2690.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z.,** 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13, 9–22.
- Newby, A.C.,** 2005. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 85, 1–31.
- Nheu, L., Nazareth, L., Xu, G.-Y., Xiao, F.-Y., Luo, R.-Z., Komesaroff, P., Ling, S.,** 2011. Physiological effects of androgens on human vascular endothelial and smooth muscle cells in culture. *Steroids* 76, 1590–1596.
- Onat, A., Avci, G.S., Barlan, M.M., Uyarel, H., Uzunlar, B., Sansoy, V.,** 2004. Measures of abdominal obesity assessed for visceral adiposity and relation to coronary risk. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 1018–1025.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Nishida, M., Matsuyama, A., Okamoto, Y., Ishigami, M., Kuriyama, H., Kishida, K., Nishizawa, H., Hotta, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Yamashita, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y.,** 2001. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103, 1057–1063.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Okamoto, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y.,** 2000. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102, 1296–1301.
- Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., Walsh, K.,** 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11, 85–97.

- Papalambros, E., Sigala, F., Georgopoulos, S., Panou, N., Kavatzas, N., Agapitos, M., Bastounis, E.,** 2004. Vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9 expression in human carotid atherosclerotic plaques: relationship with plaque destabilization via neovascularization. *Cerebrovasc Dis* 18, 160–5.
- Pedersen, S.B., Hansen, P.S., Lund, S., Andersen, P.H., Odgaard, A., Richelsen, B.,** 1996. Identification of oestrogen receptors and oestrogen receptor mRNA in human adipose tissue. *Eur.J.Clin.Invest* 26, 262–269.
- Perrin-Cocon, L., Coutant, F., Agaugué, S., Deforges, S., André, P., Lotteau, V.,** 2001. Oxidized low-density lipoprotein promotes mature dendritic cell transition from differentiating monocyte. *J Immunol* 167, 3785–3791.
- Pfaffl, M.W.,** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pou, K.M., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Vasan, R.S., Maurovich-Horvat, P., Larson, M.G., Keaney, J.F., Meigs, J.B., Lipinska, I., Kathiresan, S., Murabito, J.M., O'Donnell, C.J., Benjamin, E.J., Fox, C.S.,** 2007. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: The Framingham Heart Study. *Circulation* 116, 1234–1241.
- Projahn, D., Koenen, R.R.,** 2012. Platelets: key players in vascular inflammation. *J Leukoc Biol*.
- Querleux, B., Cornillon, C., Jolivet, O., Bittoun, J.,** 2002. Anatomy and physiology of subcutaneous adipose tissue by in vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy: relationships with sex and presence of cellulite. *Ski Res Technol* 8, 118–124.
- Rajagopalan, S., Meng, X.P., Ramasamy, S., Harrison, D.G., Galis, Z.S.,** 1996. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 98, 2572–2579.
- Rajsheker, S., Manka, D., Blomkalns, A.L., Chatterjee, T.K., Stoll, L.L., Weintraub, N.L.,** 2010. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. *Curr Opin Pharmacol* 10, 191–196.
- Rasmussen, L.M., Wolf, Y.G., Ruoslahti, E.,** 1995. Vascular smooth muscle cells from injured rat aortas display elevated matrix production associated with transforming growth factor-beta activity. *Am J Pathol* 147, 1041–8.
- Rautureau, Y., Schiffrin, E.L.,** 2012. Endothelin in hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21, 128–36.
- Razin, E., Marx, G.,** 1984. Thrombin-induced degranulation of cultured bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 133, 3282–3285.

- Renard, C.B., Kramer, F., Johansson, F., Lamharzi, N., Tannock, L.R., von Herrath, M.G., Chait, A., Bornfeldt, K.E.,** 2004. Diabetes and diabetes-associated lipid abnormalities have distinct effects on initiation and progression of atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 114, 659–68.
- Ribau, J.C., Hadcock, S.J., Teoh, K., DeReske, M., Richardson, M.,** 1999. Endothelial adhesion molecule expression is enhanced in the aorta and internal mammary artery of diabetic patients. *J Surg Res* 85, 225–33.
- Rodriguez-Vita, J., Ruiz-Ortega, M., Rupérez, M., Esteban, V., Sanchez-López, E., Plaza, J.J., Egido, J.,** 2005. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 97, 125–34.
- Ropert, S., Vignaux, O., Mir, O., Goldwasser, F.,** 2011. VEGF pathway inhibition by anticancer agent sunitinib and susceptibility to atherosclerosis plaque disruption. *Invest New Drugs* 29, 1497–9.
- Ross, R.,** 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115–126.
- Ruge, T., Sukonina, V., Myrnas, T., Lundgren, M., Eriksson, J.W., Olivecrona, G.,** 2006. Lipoprotein lipase activity/mass ratio is higher in omental than in subcutaneous adipose tissue. *Eur J Clin Invest* 36, 16–21.
- Rutherford, J.D., Pfeffer, M.A., Moye, L.A., Davis, B.R., Flaker, G.C., Kowey, P.R., Lamas, G.A., Miller, H.S., Packer, M., Rouleau, J.L.,** 1994. Effects of captopril on ischemic events after myocardial infarction. Results of the Survival and Ventricular Enlargement trial. SAVE Investigators. *Circulation* 90, 1731–1738.
- Ryoo, S.W., Kim, D.U., Won, M., Chung, K.S., Jang, Y.J., Oh, G.T., Park, S.K., Maeng, P.J., Yoo, H.S., Hoe, K.L.,** 2004. Native LDL induces interleukin-8 expression via H2O₂, p38 Kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 62, 185–193.
- Sacks, H.S., Fain, J.N.,** 2007. Human epicardial adipose tissue: A review. *Am Heart J*.
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F.,** 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983–985.
- Shah, P.K., Falk, E., Badimon, J.J., Fernandez-Ortiz, A., Mailhac, A., Villareal-Levy, G., Fallon, J.T., Regnstrom, J., Fuster, V.,** 1995. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 92, 1565–1569.
- Shehzad, A., Iqbal, W., Shehzad, O., Lee, Y.S.,** 2012. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens)* 11, 8–20.

- Schachter, M.**, 1997. Vascular smooth muscle cell migration, atherosclerosis, and calcium channel blockers. *Int J Cardiol* 62 Suppl 2, S85–S90.
- Schaub, F.J., Han, D.K.M., Liles, W.C., Adams, L.D., Coats, S.A., Ramachandran, R.K., Seifert, R.A., Schwartz, S.M., Bowen-Pope, D.F.**, 2000. Fas/FADD-mediated activation of a specific program of inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells. *Nat Med* 6, 790–796.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S.**, 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., Lodish, H.F.**, 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270, 26746–26749.
- Schlich, R., Willems, M., Greulich, S., Ruppe, F., Knoefel, W.T., Ouwens, D.M., Maxhera, B., Lichtenberg, A., Eckel, J., Sell, H.**, 2013. VEGF in the crosstalk between human adipocytes and smooth muscle cells: Depot-specific release from visceral and perivascular adipose tissue. *Mediators Inflamm* 2013, 10.
- Schraufstatter, I.U., Chung, J., Burger, M.**, 2001. IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280, L1094–L1103.
- Schwartz, S.M.**, 1997. Smooth muscle migration in vascular development and pathogenesis. *Transpl Immunol* 5, 255–260.
- Song, B., Jin, H., Yu, X., Zhang, Z., Yu, H., Ye, J., Xu, Y., Zhou, T., Oudit, G.Y., Ye, J.-Y., Chen, C., Gao, P., Zhu, D., Penninger, J.M., Zhong, J.-C.**, 2013. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates oxidative stress and VSMC proliferation via the JAK2/STAT3/SOCS3 and profilin-1/MAPK signaling pathways. *Regul Pept* 185, 44–51.
- Staiger, H., Tschritter, O., Machann, J., Thamer, C., Fritsche, A., Maerker, E., Schick, F., Häring, H.-U., Stumvoll, M.**, 2003. Relationship of serum adiponectin and leptin concentrations with body fat distribution in humans. *Obes Res* 11, 368–372.
- Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W.**, 1995. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis : A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92, 1355–1374.
- Stehouwer, C.D.A., Gall, M.-A., Twisk, J.W.R., Knudsen, E., Emeis, J.J., Parving, H.-H.**, 2002. Increased Urinary Albumin Excretion, Endothelial Dysfunction, and Chronic Low-Grade Inflammation in Type 2 Diabetes: Progressive, Interrelated, and Independently Associated With Risk of Death. *Diabetes* 51, 1157–1165.

- Suganami, T., Ogawa, Y., 2010.** Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol* 88, 33–39.
- Szasz, T., Bomfim, G.F., Webb, R.C., 2013.** The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vasc Health Risk Manag* 9, 105–16.
- Taal, M.W., Brenner, B.M., 2000.** Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int* 57, 1803–17.
- Tedgui, A., Mallat, Z., 2006.** Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86, 515–581.
- Tchernof, A., Bélanger, C., Morisset, A.-S., Richard, C., Mailloux, J., Laberge, P., Dupont, P., 2006.** Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes* 55, 1353–1360.
- Touyz, R.M., 2005.** Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* 90, 449–55.
- Trovati, M., Doronzo, G., Barale, C., Vaccheris, C., Russo, I., Cavalot, F., 2014.** Leptin and Vascular Smooth Muscle Cells. *Curr Pharm Des* 20, 625–634.
- Tummala, P.E., Chen, X.L., Sundell, C.L., Laursen, J.B., Hammes, C.P., Alexander, R.W., Harrison, D.G., Medford, R.M., 1999.** Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 100, 1223–1229.
- Ueda, K., Lu, Q., Baur, W., Aronovitz, M.J., Karas, R.H., 2013.** Rapid estrogen receptor signaling mediates estrogen-induced inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 1837–43.
- Usui, T., Morita, T., Okada, M., Yamawaki, H., 2013.** Histone Deacetylase 4 Controls Neointimal Hyperplasia via Stimulating Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* 397–403.
- Van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., Teule, G.J.J., 2009.** Cold-activated brown adipose tissue in healthy men., *The New England journal of medicine*.
- Van Vark, L.C., Bertrand, M., Akkerhuis, K.M., Brugts, J.J., Fox, K., Mourad, J.-J., Boersma, E., 2012.** Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension: a meta-analysis of randomized clinical trials of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors involving 158,998 patients. *Eur Heart J* 33, 2088–97.
- Waltenberger, J., 2009.** Wet AMD: anti-VEGF treatments in the elderly population | *The British Journal of Cardiology*. *Br J Cardiol* 16, 11–13.

- Walter, A., Etienne-Selloum, N., Sarr, M., Kane, M.O., Beretz, A., Schini-Kerth, V.B.,** 2008. Angiotensin II induces the vascular expression of VEGF and MMP-2 in vivo: Preventive effect of red wine polyphenols. *J Vasc Res* 45, 386–394.
- Wang, H., Keiser, J.A.,** 1998. Vascular Endothelial Growth Factor Upregulates the Expression of Matrix Metalloproteinases in Vascular Smooth Muscle Cells : Role of flt-1. *Circ Res* 83, 832–840.
- Wang, P., Xu, T.-Y., Guan, Y.-F., Su, D.-F., Fan, G.-R., Miao, C.-Y.,** 2009. Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mononucleotide. *Cardiovasc Res* 81, 370–380.
- Wang, X., Adhikari, N., Li, Q., Hall, J.L.,** 2004. LDL receptor-related protein LRP6 regulates proliferation and survival through the Wnt cascade in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H2376–H2383.
- Wang, Y., Liang, L., Rengui, J., Zheng, L., Liu, D.,** 2013. Oxidized High-Density Lipoprotein Induces the Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells by Promoting the Production of ROS. *J Atheroscler Thromb*.
- Watanabe, T., Pakala, R., Katagiri, T., Benedict, C.R.,** 2001. Angiotensin II and serotonin potentiate endothelin-1-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Hypertens* 19, 731–739.
- Weber, C., Schober, A., Zerneck, A.,** 2004. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1997–2008.
- Weimann, E., Blum, W.F., Witzel, C., Schwidergall, S., Böhles, H.J.,** 1999. Hypoleptinemia in female and male elite gymnasts. *Eur J Clin Invest* 29, 853–860.
- Wolff, S.P., Jiang, Z.Y., Hunt, J. V.,** 1991. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 10, 339–352.
- Wu, M.H., Lo, J.-F., Kuo, C.-H., Lin, J.A., Lin, Y.-M., Chen, L.-M., Tsai, F.-J., Tsai, C.-H., Huang, C.-Y., Tang, C.-H.,** 2012. Endothelin-1 promotes MMP-13 production and migration in human chondrosarcoma cells through FAK/PI3K/Akt/mTOR pathways. *J Cell Physiol* 227, 3016–26.
- Yang, Y.K., Chen, M., Clements, R.H., Abrams, G.A., Aprahamian, C.J., Harmon, C.M.,** 2008. Human mesenteric adipose tissue plays unique role versus subcutaneous and omental fat in obesity related diabetes. *Cell Physiol Biochem* 22, 531–538.
- Yang, Z., Krasnici, N., Lüscher, T.F.,** 1999. Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation* 100, 5–8.
- Yao, J.S., Chen, Y., Zhai, W., Xu, K., Young, W.L., Yang, G.-Y.,** 2004. Minocycline exerts multiple inhibitory effects on vascular endothelial growth factor-induced smooth

muscle cell migration: the role of ERK1/2, PI3K, and matrix metalloproteinases. *Circ Res* 95, 364–71.

Yu, H., Clarke, M.C.H., Figg, N., Littlewood, T.D., Bennett, M.R., 2011. Smooth muscle cell apoptosis promotes vessel remodeling and repair via activation of cell migration, proliferation, and collagen synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 2402–9.

Yu, H., Rifai, N., 2000. High-Sensitivity C-Reactive Protein and Atherosclerosis: From Theory to Therapy. *Clin Biochem* 33, 601–610.

Yudkin, J.S., Eringa, E., Stehouwer, C.D.A., 2005. “Vasocrine” signalling from perivascular fat: A mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet*.

Yue, T.L., Wang, X., Sung, C.P., Olson, B., McKenna, P.J., Gu, J.L., Feuerstein, G.Z., 1994. Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 75, 1–7.

Yusuf, S., Pepine, C.J., Garces, C., Pouleur, H., Rousseau, M., Salem, D., Kostis, J., Benedict, C., Bourassa, M., Pitt, B., 1992. Effect of enalapril on myocardial infarction and unstable angina in patients with low ejection fractions. *Lancet* 340, 1173–1178.

Zhang, K., Huang, X., Li, X., Feng, M., Li, L., Cai, X., Zhang, C., Liu, X., Zhang, M., Zhang, Y., Wang, X., Zhang, M., 2012. Interleukin 6 destabilizes atherosclerotic plaques by downregulating prolyl-4-hydroxylase $\alpha 1$ via a mitogen-activated protein kinase and c-Jun pathway. *Arch Biochem Biophys* 528, 127–33.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.